

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'INTERACTION DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS AVEC DES
BACTÉRIES INTACTES PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARWA LAADHARI

MAI 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier très chaleureusement ma directrice de recherche, Isabelle Marcotte, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et tes encouragements avec lesquels j'ai pu développer les atouts nécessaires à l'achèvement de ce projet. Merci de m'avoir encouragée à participer à de nombreux congrès afin d'enrichir mes compétences de communication scientifique. Merci aussi pour ta confiance et ta grande générosité.

J'adresse un second et un grand merci au Dr. Alexandre Arnold, non seulement pour son expertise et son aide dans la réalisation et la maîtrise des expériences de RMN, mais aussi pour sa disponibilité et sa patience.

Je tiens à remercier particulièrement notre collaborateur Dror Warschawski et son étudiant Xavier Warnet pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le même projet, pour leur accueil chaleureux au sein de leur laboratoire et pour leurs précieux conseils. Je remercie aussi Mathieu Babin (UQAR), le Dr. Bertrand Genard, le Pr. Éric Déziel et son étudiant Fabrice Jean-Pierre (INRS-IAF). Leur soutien technique et leurs conseils ont été très appréciés.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues étudiants du laboratoire Marcotte, soit Maïwenn Beaugrand, André-Luiz Da Silva, Frédéric Byette, David Chokouadeu, Souryvanh Nirasay, Andrée Gravel et Zeineb Bouhel, ainsi que les stagiaires : Antoine Juneau, Catherine Lanthier, Jean-Philippe Bourgouin et Laurence Caron pour tous les agréables moments partagés ensemble. Un merci spécial à Andrée Gravel, la première

personne qui m'a guidée et soutenue dans ce laboratoire. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur le plan professionnel, mais aussi pour nos cours de sport, nos profondes discussions et tes bonnes recettes.

Je tiens à souligner que je suis très reconnaissante envers la faculté de sciences de l'UQAM, la fondation de l'UQAM, le Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP) et le centre de recherche Pharmaqam, qui, grâce à leur générosité, m'ont permis de compléter mes deux années d'études sans soucis financier.

Je crois que je ne pourrais jamais assez remercier ma famille, et particulièrement mes parents qui sont ma source d'inspiration. Je ne serais sûrement pas rendue ici sans eux. Merci de toujours croire en moi et en mes projets professionnels et personnels. Merci pour votre soutien (dans tous les sens), encouragement et amour. Vous êtes formidables !

Et un dernier merci à Houssine, qui a partagé avec moi ces trois dernières années, que ce soit de loin ou de près. Merci pour m'avoir aidé à relativiser quand tout semblait aller mal, et pour nos fous rires.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES	XI
LISTE DES UNITÉS	XVI
RESUME	XVIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Bactéries résistantes aux antibiotiques	1
1.2 Peptides antimicrobiens	4
1.2.1 Caractéristiques des peptides antimicrobiens naturels	4
1.2.2 Structure des AMPs	4
1.2.3 Mécanisme d'action des AMPs	7
1.3 Caérine 1.1 et auréine 1.2.....	8
1.3.1 Structure	9
1.3.2 Activité antimicrobienne	10
1.4 Bactéries.....	12
1.4.1 Membranes/parois bactériennes.....	12
1.4.2 Membranes modèles.....	17
1.5 Mécanisme d'action membranaire des AMPs	20
1.5.1 Déstabilisation membranaire en tapis (<i>carpet-like mechanism</i>).....	20
1.5.2 Le modèle des pores en douve de tonneaux (<i>barrel stave model</i>).....	21
1.5.3 Le modèle des pores toroïdaux (<i>toroidal-pore</i>).....	22
1.6 Importance de l'étude des interactions <i>in vivo</i>	23
1.7 Marquage et étude des bactéries par RMN	24

1.7.1 RMN du deutérium pour l'étude des membranes bactériennes.....	24
1.7.2 RMN du carbone pour la caractérisation des bactéries	27
1.8 Objectifs	27
CHAPITRE II	
ASPECTS THEORIQUES DES METHODES UTILISEES	29
2.1 RMN de l'état solide pour l'étude des bactéries.....	29
2.1.1 Anisotropie de déplacement chimique	29
2.1.2 Couplage dipolaire.....	31
2.1.3 Interactions quadripolaires	33
2.1.4 La rotation à l'angle magique	35
2.2 RMN du deutérium pour l'étude des membranes bactériennes.....	36
2.2.1 L'écart quadripolaire et moments spectraux pour l'analyse des spectres de RMN- ² H	36
2.2.2 Séquence d'impulsions d'écho solide	39
2.2.3 Séquence d'impulsions d'écho de Hahn	40
2.3 RMN- ¹³ C pour l'étude des bactéries entières	40
2.3.1 Impulsion directe	40
2.3.2 Le découplage	41
2.3.3 L'effet NOE (<i>Nuclear Overhauser effect</i>)	41
2.4 Détermination de la viabilité cellulaire	42
2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice d'AMP	43
CHAPITRE III	
OPTIMISATION DU MARQUAGE DES BACTÉRIES <i>E. COLI</i> ET ÉTUDE DE LEURS MEMBRANES EN MAS	46
3.1 Introduction et objectifs	46
3.2 Matériel et méthodes	47
3.2.1 Matériel	47
3.2.2 Préparation des échantillons.....	48
3.2.3 Analyse du profil lipidique par GC-MS.....	48
3.2.4 Expériences de RMN.....	49
3.2.5 Analyse de la viabilité cellulaire.....	50

3.3	Résultats et discussion.....	50
3.3.1	Optimisation du marquage en ^2H des phospholipides membranaires d' <i>E. coli</i>	50
3.3.2	Caractérisation d' <i>E. coli</i>	51
3.4	Conclusion	55
CHAPITRE IV		
INTERACTION OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES CAERIN 1.1 AND AUREIN 1.2 WITH INTACT BACTERIA BY ^2H SOLID-STATE NMR.....		57
4.1	Résumé	58
4.2	Abstract	59
4.3	Introduction.....	60
4.4	Materials et methods	62
4.4.1	Materials.....	62
4.4.2	Minimum inhibitory concentration.....	62
4.4.3	Sample preparation	62
4.4.4	Lipid analysis and viability of <i>Bacillus subtilis</i>	63
4.4.5	NMR experiments and moments analysis.....	63
4.5	Results and discussion.....	65
4.5.1	Characterization of ^2H -labelled <i>B. subtilis</i>	65
4.5.2	Effect of caerin 1.1 and aurein 1.2 on <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>	68
4.6	Conclusion	74
4.7	Acknowledgements	75
4.8	Supplementary material	75
CHAPITRE V		
DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES DE MARQUAGE POUR LA CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES ENTIÈRES.....		82
5.1	Objectifs	82
5.2	Matériel et méthodes	83
5.2.1	Matériel	83
5.2.2	Préparation des bactéries marquées au ^{13}C	83
5.2.3	Extraction des lipides de <i>B. subtilis</i>	84

5.2.4 Hydrolyse des lipides	84
5.3 Résultats et discussion.....	86
5.3.1 Attribution spectrale des constituants d' <i>E. coli</i> et de <i>B. subtilis</i>	86
5.3.2 Optimisation du protocole d'incorporation des lipides	91
5.3.3 Effaçage des lipides	93
5.4 Conclusion	97
CHAPITRE VI	
CONCLUSION	100
ANNEXE	
A.1 Article publié dans Biochimica et Biophysica Acta 1858 (2016), 146-152	105
A.2 Article publié dans Biochimica et Biophysica Acta 1858 (2016), 2959-2964	105
REFERENCES	119

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Structure secondaire de quelques AMPs représentant les quatre types de repliement de base (Peters <i>et al.</i> , 2010)	7
Figure 1.2 Illustration des mécanismes d'action des AMPs (Peters <i>et al.</i> , 2010) avec permission.	8
Figure 1.3 Structures de la caérine 1.1 (en haut) et de l'auréine 1.2 (en bas) dans eau : TFE. (Apponyi <i>et al.</i> , 2004).	9
Figure 1.4 Enveloppes des bactéries à Gram- et Gram+. LPS : lipopolysaccharides, ME : membrane externe, PGN : peptidoglycane, OMP : protéine de la membrane externe (<i>Outer membrane protein</i>), PAC : protéine attachée de façon covalente, TA : acide téichoïque, LTA : acide lipotéichoïque.	13
Figure 1.5 Schématisation de la structure du peptidoglycane.	13
Figure 1.6 Structure de lipopolysaccharides d' <i>E. coli</i> . Kdo, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; Glu, D-glucose; Gal, D-galactose; EtN, ethanolamine; P, phosphate (Ruiz <i>et al.</i> , 2009).	15
Figure 1.7 Structure des acides téichoïques (TA) composés de GroP-ManNAc-GlcNAc et liés d'une façon covalente au peptidoglycane (PGN) (a) et celle des acides lipotéichoïques (LTA) de <i>B. subtilis</i> , composés de TA liés à un diglycéride par une liaison ester (b). R indique les acides gras. (Brown <i>et al.</i> , 2013; Percy et Gründling, 2014).	17
Figure 1.8 Organisation des phospholipides en milieux aqueux. (A) Micelle, (B) Bicelle, (C) Vésicule unilamellaire et (D) Vésicule multilamellaire (coupe vue de dessus).	18
Figure 1.9 Phospholipides courants des membranes modèles bactériennes.	19
Figure 1.10 Mélanges lipidiques courants des membranes modèles. (A) Modèle de bactérie Gram-. (B) Modèle de bactérie Gram+.	20
Figure 1.11 Modèle de déstabilisation membranaire en tapis " <i>carpet like</i> ". (Brogden, 2005), avec permission.	21

Figure 1.12	Modèle en douves de tonneaux " <i>barrel stave</i> ". (Brogden, 2005), avec permission.	22
Figure 1.13	Modèle des pores toroïdaux. (Brogden, 2005), avec permission.	23
Figure 1.14	Schématisation des principales étapes d'incorporation des acides gras (AG) exogènes dans la biosynthèse des phospholipides (PL) chez <i>E. coli</i> sauvage.	26
Figure 2.1	Schématisation de l'anisotropie de déplacement chimique en RMN-ÉS et du spectre de poudre qui résulte de toutes les orientations possibles des nuages électroniques (Schmidt et Spiess, 1994), avec permission.	30
Figure 2.2	Schématisation du couplage dipolaire entre deux moments magnétiques..	32
Figure 2.3	Modification des niveaux énergétiques due aux interactions quadripolaires. Adapté de (Marcotte, 2016)	34
Figure 2.4	Spectre RMN- ^2H statique de vésicules de phospholipides ayant une seule position deutérée le long de la chaîne acyle. Adapté de (Marcotte, 2016). ...	35
Figure 2.5	Schématisation du principe de la rotation à l'angle magique.	36
Figure 2.6	Spectre RMN- ^2H statique de vésicules multilamellaires de phospholipides ayant des chaînes acyles entièrement deutérées. Adapté de Marcotte, 2016. ...	37
Figure 2.7	Spectre de RMN- ^2H de bactéries <i>E. coli</i> (BL21) intactes avec les phospholipides deutérés, analysées <i>in vivo</i> à 37 °C (Tardy-Laporte <i>et al.</i> , 2013).	38
Figure 2.8	Séquence d'impulsions d'écho quadripolaire où D_1 est le délai entre les acquisitions et τ le délai entre les impulsions.	39
Figure 2.9	Séquence d'impulsions d'écho de Hahn modifiée où D_1 est le délai entre les acquisitions et τ le délai entre les impulsions.	40
Figure 2.10	Séquence d'impulsions avec excitation directe avec découplage hétéronucléaire.	41
Figure 2.11	Séquence d'impulsions avec excitation directe et découplage hétéronucléaire, employant l'effet NOE.	42
Figure 2.12	Schématisation de la réaction de réduction MTT en cristaux de formazan.	43
Figure 3.1	Spectres statiques et MAS (à 10 kHz) en ^2H de cellules entières d' <i>E. coli</i> cultivées en présence de PA- d_{31} à différentes températures (15, 30 et 45 °C).	

Les spectres statiques sont obtenus avec 20 k scans (3 heures) et les spectres en MAS avec 2 k scans (20 minutes).	52
Figure 3.2 Spectres statiques et MAS (à 10 kHz) en ^2H de cellules entières d' <i>E. coli</i> cultivées en présence de PA- d_{31} et d'OA protoné à différentes températures (15, 30 et 45 °C). Les spectres statiques sont obtenus avec 20 k scans (3 heures) et les spectres en MAS avec 2 k scans (20 minutes).	53
Figure 3.3 Valeurs de moments spectraux M_2 calculés à partir des spectres en MAS à 10 kHz d' <i>E. coli</i> cultivées en présence de PA- d_{31} (en noir) en présence de PA- d_{31} +OA (en rouge).	55
Figure 4.1 Effect of deuterium labelling protocol on lipid profile (n =2) and cell viability (n = 3) of <i>B. subtilis</i> . Black: unlabelled, and gray: ^2H -labelled bacteria	66
Figure 4.2 MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact <i>B. subtilis</i> acquired at 12°C, 32°C and 52°C with 8 k scans. The equilibration time in these experiments was 15 min.....	67
Figure 4.3 MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> acquired at 37°C with 8 k scans and with addition of MIC of caerin 1.1 or aurein 1.2. ..	70
Figure 4.4 ^2H MAS NMR spectra of intact <i>B. subtilis</i> acquired at 37°C and with 8 k scans and with the addition of different concentrations of (a) caerin 1.1, and (b) aurein 1.2.....	73
Figure 4.5 ^2H solid-state NMR spectra of intact <i>B. subtilis</i> acquired at 15°C, 30°C and 52°C with 100 k scans. The equilibration time between each temperature was 15 min.	76
Figure 4.6 ^2H solid-state NMR spectra of intact <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> acquired at 37°C with 100 k scans and with the addition of the MIC of caerin 1.1 and aurein 1.2.....	79
Figure 4.7 ^2H solid-state NMR spectra of intact <i>B. subtilis</i> acquired at 37°C with 100 k scans and with the addition of different concentration of (a) caerin 1.1, and (b) aurein 1.2.....	80
Figure 5.1 Courbe de croissance de <i>B. subtilis</i> en fonction de la concentration du glycérol- $^{13}\text{C}_3$	84
Figure 5.2 Structure des phospholipides et nomenclature des carbones.	88
Figure 5.3 Spectres NOE-DP d' <i>E. coli</i> (en haut), et de <i>B. subtilis</i> (en bas) intactes à 10 kHz.	89

- Figure 5.4 Spectres NOE-DP du PGN purifié de *B. subtilis* non marquée. Les spectres ont été enregistrés à 400 MHz et le nombre de scans pour chaque expérience est de 6144 pour une durée de 8h30. Les LTA de *B. subtilis* ont été éliminés par un traitement des cellules au SDS (4%). Ces cellules ont été ensuite éclatées par ultra sonication, traitées avec de l' α amylase (EC 3.2.1.1; Sigma; 100 pg/mL) préparée dans Tris-HCl (pH 7.5) pendant 2h, un mélange de DNase (EC 3.1.21.1; Sigma; 10 pg/mL) et RNase (EC 3.1.27.5; Sigma; 50 pg/mL) avec $MgSO_4$ (20 mM) pendant 2h, et avec de la trypsine (100 pg/mL) préparée dans 10 mM de $CaCl_2$, pendant 16h. Enfin, trois lavages ont été effectués par LiCl (8M), EDTA (100mM) et de l'eau, successivement. Le PGN avec les acides téichoïques intacts récupérés dans le surnageant ont été lyophilisés et réhydratés à 70% avant d'être transférés dans un rotor de 4mm. 91
- Figure 5.5 Cinétique de croissance de *B. subtilis* (en haut) et d'*E. coli* (en bas) dans un milieu M9 additionné de 3g/L de glycérol- $^{13}C_3$ en présence d'acide palmitique incorporé dans différentes concentrations de DPC et de Tween 20. 92
- Figure 5.6 Spectres NOE-DP à 10 kHz de *B. subtilis* marquée au ^{13}C dans les différentes conditions de culture..... 94
- Figure 5.7 Spectres NOE-DP à 10 kHz d'*E. coli* marquée au ^{13}C dans les différentes conditions de culture. 95
- Figure 5.8 Spectres NOE-DP à 10 kHz d'*E. coli* marquée au ^{13}C (en rouge) et d'*E. coli* marquée au ^{13}C en présence de lipides totaux hydrolysés (en noir). .. 96
- Figure 5.9 Intensité du pic des carbones méthylènes avec un déplacement chimique de 30 ppm pour chaque condition de cultures analysées pour *E. coli* et *B. subtilis*. Il est important de préciser que chaque condition de culture a été réalisée qu'une fois, et que les données présentées sont qualitatives..... 97
- Figure 6.1 Schématisation du mécanisme d'action de la caérine 1.1 et de l'auréine 1.2. **Error! Bookmark not defined.**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Illustration des principales classes d'antibiotiques et des modes de résistance adaptés par les pathogènes. (Davies et Davies, 2010).....	3
Tableau 1.2 Classification des AMPs en fonction de leur structure	6
Tableau 1.3 Composition phospholipidique d' <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .(Bishop <i>et al.</i> , 1967; Clejan <i>et al.</i> , 1986; Esfahani <i>et al.</i> , 1969)	15
Tableau 3.1 Composition en acides gras d' <i>E. coli</i> en fonction de différentes conditions de culture, déterminées par GC-MS.....	51
Tableau 3.2 Pourcentage de cellules survivantes (cultivées en présence d'acide palmitique deutéré) avec ou sans rotation à l'angle magique à 10 kHz. Ces pourcentages ont été déterminés par des tests d'activité de réduction du MTT.	53
Table 4.1 Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labeled <i>B. subtilis</i> at different temperatures ^a	68
Table 4.2 Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labelled <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> , without and with the presence of AMPs at different concentrations.....	71
Table 4.3 Fatty acid composition of labelled and unlabelled <i>B. subtilis</i> phospholipids by GC-MS with standard deviation.....	75
Table 4.4 Percentage of live <i>B. subtilis</i> after rinsing and NMR experiments, by MTT reduction activity. The mean values with standard deviation are obtained in triplicate.....	76
Table 4.5 Spectral moment analysis with standard deviation of static ^2H solid-state NMR spectra of labeled <i>B. subtilis</i> , at different temperatures.....	77
Table 4.6 Antibacterial activity of caerin 1.1 and aurein 1.2.	77

Table 4.7 Spectral moment analysis with standard deviation of static ^2H solid-state NMR spectra of labeled <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> , without and with the presence of AMPs at different concentrations.	78
Tableau 5.1 Constituants des membranes bactériennes et attribution de leurs déplacements chimiques en RMN du ^{13}C	90

LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES

^{12}C	Isotope de masse 12 du carbone
^{13}C	Isotope de masse 13 du carbone
^{15}N	Isotope de masse 15 de l'azote
^2H	Deutérium
^{31}P	Isotope de masse 31 du phosphore
ADC	Anisotropie du déplacement chimique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AL	Alabama
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
B_0	Champ magnétique
B_{eff}	Champ magnétique effectif

BHP	<i>Bovine hemoglobin peptide</i>
C15	Acide pentadécanoïque
C16:0	Acide palmitique
C17	Acide margarique
C18	Acide stéarique
CL	Cardiolipine
CMC	Concentration micellaire critique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
C-O	Liaison carbone hydrogène
Da	Unité de masse volumique (Dalton)
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycérol (dimyristoyl-phosphatidylglycerol)
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité optique
DPC	Dodécylphosphocoline
DPPC	1-docosahexaénoyl 1-2palmitoyl-sn-glycérol-3-phosphatidylglycérol
DPPG	1-docosahexaénoyl 1-2palmitoyl-sn-glycérol-3-phosphocoline

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EFG	<i>Electric field gradient</i>
FID	<i>Free induction Decay</i>
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse
Gram-	Gram négatif
Gram+	Gram positif
GRASP	Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines
IBPC	Institut de biologie physico-chimique
INRS-IAF	Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand Frappier
LP	Lipides polaires
LPH	Lipides polaires hydrolysés
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lipides totaux
LTA	Acide lipotéichoïque (<i>lipoteichoic acid</i>)
LTH	Lipides totaux hydrolysés
M ₁	Premier moment spectral (<i>first spectral moment</i>)
M ₂	Deuxième moment spectral (<i>second spectral moment</i>)

MAS	<i>Magic Angle spinning</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
ME	Membrane externe
MeOH	Méthanol
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
M _n	Moments spectraux (<i>spectral moments</i>)
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAM	Acide N-Acétyl-Muramique
NJ	<i>New Jersey</i>
NOE	<i>Nuclear overhauser effect</i>
NSERC	<i>Natural Sciences and Engineering Research Council</i>
OA	<i>Oleic acid</i>
OMP	Protéine de la membrane externe (<i>Outer membrane protein</i>)
PAC	protéine attachée de façon covalente
PA-d ₃₁	Acide palmitique deutéré (deuterated palmitic acid)
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine

PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PGN	Peptidoglycane
POPC	Palmitoyloléoylphosphatidylcholine
POPE	Palmitoyloléoylphosphatidyléthanolamine
REDOR	<i>Rotational echo double resonance</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNase	Ribonucléase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCD	Paramètre d'ordre du lien carbone deutérium (<i>order parameter of the carbon deuterium bond</i>)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
TA	Acide téichoïque (<i>teichoic acid</i>)
Tween 20	Monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitane
$\Delta\nu_Q$	Écart quadripolaire
γ	Rapport gyromagnétique

LISTE DES UNITÉS

°C	Unité de température (degré Celsius)
μL	Unité de volume (microlitre)
Da	Unité de masse volumique (Dalton)
g	Unité d'accélération (gravité)
h	Unité de temps (heure)
Hz	Unité de fréquence (hertz)
k	Kilo
min	Unité de temps (minute)
mL	Unité de volume (millilitre)
mM	Unité de concentration (millimolaire)
Mol	Unité de quantité de matière (mole)
nm	Unité de distance (nanomètre)
pg	Unité de masse (picogramme)
rpm	Unité de fréquence (tours par minute, <i>rotation per minute</i>)
s	Unité de temps (seconde)
t	Unité de masse (tonne)
W	Unité de puissance (watts)
μg	Unité de masse (microgramme)

RESUME

Le développement de nouveaux antibiotiques, motivé par la résistance bactérienne, possède un grand intérêt pour les peptides antimicrobiens (AMPs) ayant un mécanisme d'action basé sur la perturbation membranaire. L'objectif de ce projet était d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'action de la caérine 1.1 et de l'auréine 1.2, deux AMPs extraits de la peau de grenouilles australiennes et très actifs contre les bactéries. Pour ce faire, la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS) *in vivo* a été employée car elle tient compte de tous les constituants de la paroi cellulaire. Dans un premier temps, nous avons réalisé le marquage des membranes d'*E. coli* (Gram-) et de *B. subtilis* (Gram+) avec l'utilisation de l'acide palmitique deutéré PA-d₃₁ afin de les étudier par RMN-²H. Nos résultats montrent que le profil lipidique d'*E. coli* marquée est similaire à celui d'*E. coli* sauvage avec l'ajout de l'OA au PA-d₃₁, mais cet ajout n'est pas nécessaire dans le cas de *B. subtilis*. Le taux de marquage de ~ 70% pour les deux bactéries procure un bon rapport signal sur bruit lors des analyses de RMN-²H. Nous avons par la suite exploré l'application de la rotation à l'angle magique (MAS, *magic angle spinning*) en RMN-ÉS. En plus de permettre un gain en temps pendant l'analyse et un gain en sensibilité, les informations dynamiques extraites par le calcul des moments spectraux sont similaires à celles obtenues en mode statique. Les expériences de RMN-ÉS-²H en MAS réalisées sur les deux bactéries, en absence et en présence des AMPs, montrent que la caérine 1.1 et l'auréine 1.2 provoquent le désordre des membranes bactériennes. Contrairement à l'observation de cet effet à la concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides chez *E. coli*, une concentration supérieure à la CMI est nécessaire pour *B. subtilis*. Ce résultat semble indiquer que les acides téichoïques du peptidoglycane (PGN)

interagissent avec les AMPs et entravent leur accès aux membranes lipidiques. Dans le but à long terme de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les bactéries intactes par RMN- ^{13}C afin de les caractériser dans un premier temps et identifier les signaux des constituants du PGN. Cependant, la complexité des spectres entiers empêchent une attribution complète. Nous avons donc tenté d'effacer les signaux des lipides afin de simplifier les spectres. Pour ce faire, des lipides totaux et des lipides polaires, hydrolysés et non, ainsi que les acides palmitique et oléique, tous non marqués, ont été ajoutés dans le milieu de culture des bactéries en présence du glycérol- $^{13}\text{C}_3$. Cette méthode a contribué à la diminution de l'intensité de tous les pics des lipides avec un meilleur taux d'effaçage dans le cas des acides gras par rapport aux lipides totaux. L'étape d'hydrolyse des lipides est donc nécessaire. De plus, cette méthode d'effaçage nous a permis d'observer un meilleur taux d'effaçage dans le cas de *B. subtilis*, et ceci peut être dû à la différence des parois cellulaires d'*E. coli* (Gram-) et *B. subtilis* (Gram+).

Mots clés : peptides antimicrobiens, bactérie à Gram négatif, bactérie à Gram positif, rotation à l'angle magique, interaction membranaire, structure.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Bactéries résistantes aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques depuis plus de 70 ans a certainement joué un rôle important dans la médecine avec des millions de vies sauvées. La découverte de la pénicilline en 1928, les sulfamidés en 1932 et la gramicidine en 1939 a été révolutionnaire pour les traitements de maladies infectieuses telles que les méningites d'origine bactérienne, les infections de la peau et les infections pulmonaires qui provoquent de nombreux décès (Bosch et Rosich, 2008; Fleming, 1929). Depuis, il y a eu une croissance de la recherche de nouvelles sources d'antibiotiques et leur utilisation estimée à 100,000 tonnes par année a induit l'émergence des souches bactériennes résistantes qui dominent les hôpitaux (Chang *et al.*, 2015) responsables de deux millions de maladies et 23,000 cas de décès en 2016, estimés par les *centers of Disease Control and Prevention* aux États Unis (Thayer, 2016).

Ces centres avaient aussi montré en 2013, que les bactéries à Gram-négatif (Gram-) multirésistantes représentent une proportion importante des menaces de résistance (par exemple, les entérobactéries, *Acinetobacter* et *Pseudomonas*) (Centres for disease control prevention, 2013). Parmi ces bactéries, on note l'apparition rapide d'un *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline. Peu de temps après fut la découverte de plusieurs *S. aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Ces bactéries ainsi que les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE, *Vancomycin-Resistant Enterococci*) sont inquiétantes.

De plus, les bactéries peuvent être également résistantes à plusieurs antibiotiques (MDR, *multidrug-resistant*). En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé que 440 000 nouveaux cas de tuberculose MDR ont été contractés durant l'année, ce qui représente 3,6% des cas de tuberculose (World Health Organization, 2010).

Cette évolution des bactéries résistantes est en fait liée à leur capacité à développer différents mécanismes de résistance (Krašovec et Jerman, 2003) qui rendent la situation complexe. Ces mécanismes reposent sur la modification ou la surproduction de l'enzyme cible diminuant l'effet de son inhibition sur la mort bactérienne, la dégradation et ou la modification chimique de l'antibiotique induisant son inactivation, la modification de la perméabilité membranaire et l'activation de pompes à efflux qui expulsent l'antibiotique de la cellule bactérienne. Parallèlement à cette évolution rapide des bactéries résistantes, parmi les principales classes d'antibiotiques illustrées dans le Tableau 1.1 seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques ont émergé depuis les 20 dernières années. Il s'agit des oxazolidinones (2000) et des lipopeptides (2003) destinés au traitement des infections à bactéries de Gram-positives (Gram+) (Butler et Cooper, 2011; Livermore *et al.*, 2011; Ziemiska *et al.*, 2013). Ce tableau illustre quelques exemples des antibiotiques utilisés et montre que les pathogènes sont capables de développer différents mécanismes de résistance afin d'altérer une variété de cibles. Par exemple, les bactéries peuvent excréter les oxazolidinones par le système d'efflux cellulaire afin de diminuer leur concentration intracellulaire.

Ces faits expliquent l'intérêt de développer de nouveaux agents ayant de nouveaux mécanismes d'action qui engendrent un minimum de résistance. À cet égard, les peptides antimicrobiens naturels ayant pour mécanisme d'action la perturbation des membranes représentent des bon candidats pour le développement de nouveaux antibiotiques avec un phénomène de résistance moindre (Epand et Epand, 2011).

Tableau 1.1 Illustration des principales classes d'antibiotiques et des modes de résistance adoptés par les pathogènes. (Davies et Davies, 2010).

Classes d'antibiotiques	Exemples	Cibles	Modes de résistance
Oxazolidinones	Linezolid	Traduction	Efflux, cible altérée
Lipopeptides	Daptomycine	Membrane cellulaire	Cible altérée
β -lactames	Pénicillines, Céphalosporin, Monobactames	Biosynthèse peptidoglycane	Hydrolyse, efflux, cible altérée
Aminoglycosides	Gentamicine, Streptomycine, Spectinomycine	Traduction	Phosphorylation, acétylation, nucléotidylation, efflux, cible altérée
Glycopeptides	Vancomycine, Teicoplanine	Biosynthèse peptidoglycane	Reprogrammation de la biosynthèse du peptidoglycane
Marcolides	Érythromycine, Azithromicine	Traduction	Hydrolyse, glycolisation, phosphorylation, efflux, cible altérée
Lincosamides	Clindamycine	Traduction	Nucléotidylation, efflux, cible altérée
Streptogramines	Synercid	Traduction	C-O lyase, acétylation, efflux, cible altérée
Phénicol	Chloramphénicol	Traduction	Acétylation, efflux, cible altérée
Quinolones	Ciprofloxacine	Réplication ADN	Acétylation, efflux, cible altérée
Pyrimidines	Triméthopine	Synthèse ADN	Efflux, cible altérée
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole	Synthèse ADN	Efflux, cible altérée
Rifamycines	Rifampine	Transcription	Ribosylation, efflux, cible altérée
Peptides cationiques	Colistin	Membrane cellulaire	Cible altérée, efflux

1.2 Peptides antimicrobiens

1.2.1 Caractéristiques des peptides antimicrobiens naturels

Les peptides antimicrobiens (AMP, *antimicrobial peptides*) naturels sont retrouvés abondamment dans la nature dans tous les organismes vivants : champignons, plantes, oiseaux mammifères, crustacés, amphibiens et bactéries (Conlon et Sonnevend, 2010; Leippe, 1999; Maróti *et al.*, 2011; Rajanbabu et Chen, 2011). Ce sont de peptides multifonctionnels qui représentent des agents de défense contre un large spectre de pathogènes (Fehri *et al.*, 2007; Hadley et Hancock, 2010; Hancock et Diamond, 2000; Hancock et Scott, 2000; Jenssen *et al.*, 2006). En effet ils présentent des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires et anticancéreuses. De plus, par rapport aux antibiotiques courants, ils développent moins de résistance chez les agents pathogènes compte tenu de leur rapidité à les neutraliser (Hadley et Hancock, 2010). Ces facteurs font en sorte que le domaine de la recherche sur les AMPs a pris énormément d'ampleur et le nombre de peptides naturels identifiés ne cesse d'augmenter (Wang *et al.*, 2009).

1.2.2 Structure des AMPs

Les peptides antimicrobiens comportent en moyenne entre 20 et 50 acides aminés, dépassant rarement 5 kDa. La présence de résidus d'acides aminés arginine et lysine chargés positivement confère aux AMPs un caractère cationique variant généralement entre +2 et +9. Ils possèdent également un pourcentage allant jusqu'à 50 % d'acides aminés hydrophobes (Apponyi *et al.*, 2004). Les peptides antimicrobiens adoptent une structure amphiphile en présence d'une membrane. Ce caractère ainsi que les charges positives seraient en grande partie responsables de leur activité antimicrobienne (Powers et Hancock, 2003).

Selon leur charge globale, leur composition et leur structure (secondaire et tertiaire, la présence de ponts disulfure) (Boman, 1995; Gennaro et Zanetti, 2000; Shai, 2002), les

AMP peuvent se regrouper sous cinq grandes classes. Les peptides anioniques (e.g. les dermicidines), les peptides comportant des résidus cystéine formant des ponts disulfure (e.g. les défensines), les peptides riches en acides aminés spécifiques tels que les indolicidines riches en tryptophane et les drosocines riches en proline et en arginine (Jacobson *et al.*, 2007), les peptides dérivés de protéines plus grandes (e.g. casocidine) et les peptides cationiques linéaires comportant des hélices α (e.g. magainine). Le Tableau 1.2 présente quelques exemples d'AMPs de chaque classe. En général, les AMPs peuvent adopter quatre types de structures secondaires : l'hélice α , le feuillet β , le coude et la pelote déroulée (Atindehou, 2012; Jenssen *et al.*, 2006). Ce sont ces structures secondaires (Figure 1.1) qui déterminent l'interaction des AMPs avec les membranes des pathogènes (Atindehou, 2012).

Tableau 1.2 Classification des AMPs en fonction de leur structure

Classes des AMPs	Séquence primaire	Charge nette à pH 7	Références
Anioniques			
- Dermicidine DCD-1L (humain)	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGK LGKDAVEDLESGKGAVHDV KDVLD ^{SVL} -NH ₂	-1.9	(Paulmann <i>et al.</i> , 2012)
- Maximine H5 (amphibien)	ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL- NH ₂	-3	(Lai <i>et al.</i> , 2002)
Comportants des résidus cystéine formant des ponts dissulfures			
- β - défensine 1 (humain)	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFT KIQGT ^{CYR} GKAKCCK-NH ₂	+3.7	(Wang, G., 2010)
Dérivés de protéines plus grandes			
- Casocidine-I (caséine bovine)	KTKLTEEEKNRLN ^{FL} KKISQR YQKFALPQYLKTVYQH ^{QK} - NH ₂	+7.1	(Zucht <i>et al.</i> , 1995)
- BHP (hémoglobine bovine)	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSA QVKGHGAK-NH ₂	+2.3	
Riches en acides aminés spécifiques			
- Indolicidines (insecte)	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	+3	(Hsu <i>et al.</i> , 2005)
Cationiques linéaires comportants des hélices α			
- Magainine-2 (amphibien)	GIGKFLHS ^{AKK} FGKAFVGEIM NS-NH ₂	+3	(Matsuzaki <i>et al.</i> , 1997)
- Caérine 1.1 (amphibien)	GLLSVLG ^{SVAK} HVLPHVVPVI AEHL-NH ₂	+1.3	(Gehman <i>et al.</i> , 2008)
- Auréine 1.2 (amphibien)	GLFDI ^{IKK} IAESF-NH ₂	+1	(Gehman <i>et al.</i> , 2008)

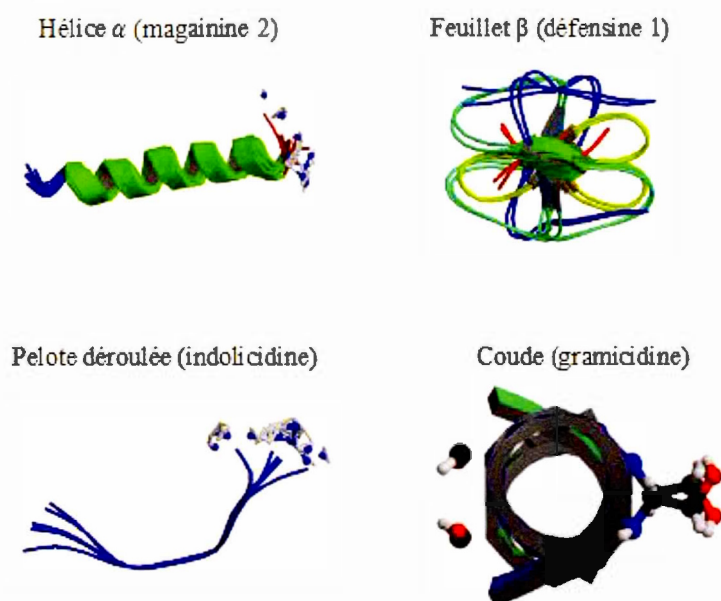


Figure 1.1 Structure secondaire de quelques AMPs représentant les quatre types de repliement de base (Peters *et al.*, 2010)

1.2.3 Mécanisme d'action des AMPs

En fonction de leurs cibles et de leurs activités, les modes d'action des peptides peuvent se résumer en deux groupes : les mécanismes de déstabilisation membranaire et les mécanismes intracellulaires (Figure 1.2). Les peptides qui sont capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule inhibent la synthèse de la paroi cellulaire, l'activité de certains enzymes, ainsi que celle de certaines protéines, de l'ADN et l'ARN (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2010). À titre d'exemple, il a été démontré que les histatines inhibent l'activité enzymatique (Brogden, 2005).

Cependant, la plupart des AMPs agissent sur la membrane pathogène (Michel, 2010). Trois modèles d'insertion et de perméabilisation membranaire ont été proposés. Ils sont illustrés sur la Figure 1.2, mais ils seront détaillés dans la section 1.5. Il est important de noter que dans le cas des AMPs à activité membranaire, le pathogène, en absence

de cible spécifique, devient moins apte à développer de la résistance (Hoskin et Ramamoorthy, 2008).

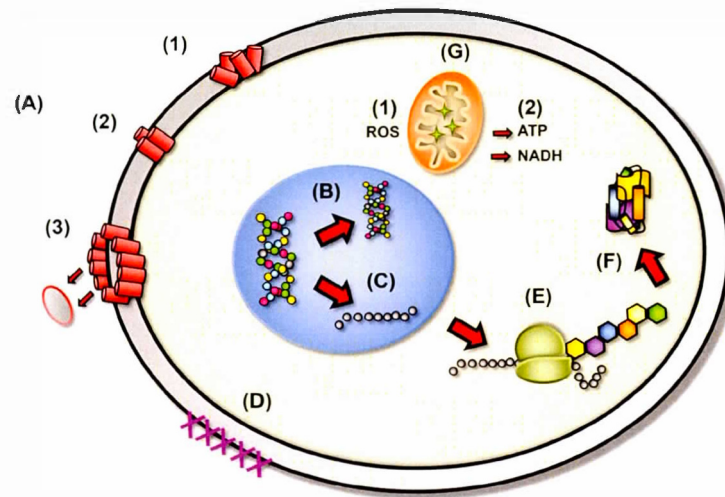


Figure 1.2 Illustration des mécanismes d'action des AMPs (Peters *et al.*, 2010) avec permission.

(A) Perturbation de l'intégrité membranaire : (1) Formation de tapis, (2) Formation de pores toroïdaux par l'alignement des séquences hydrophobes, et (3) la formation des pores en douves. (B) Inhibition de la synthèse d'ADN. (C) Blocage de la synthèse d'ARN. (D) Inhibition des enzymes qui assurent la synthèse des protéines. (E) Inhibition de l'activité ribosomale et la synthèse protéique. (F) Blocage des protéines chaperonnes nécessaires pour le repliement des protéines. (G) Bloquage de la voie mitochondriale par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou déstabilisation de l'intégrité par efflux d'ATP et de NADH.

1.3 Caérine 1.1 et auréine 1.2

Les sécrétions de peau de grenouilles australiennes sont riches en peptides antimicrobiens (Boland et Separovic, 2006). Dans ce projet, on s'intéresse à la caérine 1.1 et l'auréine 1.2 produites par des grenouilles arboricoles du genre *Litoria*.

1.3.1 Structure

La caérine 1.1 composée de 25 acides aminés (GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL-NH₂) et l'auréine 1.2 composée de 13 acides aminés (GLFDIIKKIAESF-NH₂) possèdent des ressemblances structurales (Tableau 1.2). Elles sont cationiques avec des charges nettes de +1 (auréine 1.2) et +4 (caérine 1.1). Elles possèdent une section N-terminale constituée de glycine et leucine et d'une section C-terminale essentielle pour l'activité antimicrobienne (Boland et Separovic, 2006; Rozek *et al.*, 1998). L'auréine 1.2 contient des résidus de lysine aux positions 7 et 8, mais la caérine 1.1 contient des complexes lysine-histidine aux positions 11 et 12. Leurs structures obtenues dans un mélange d'eau : 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) utilisé pour mimer l'environnement hydrophobe des membranes sont montrées à la Figure 1.3.

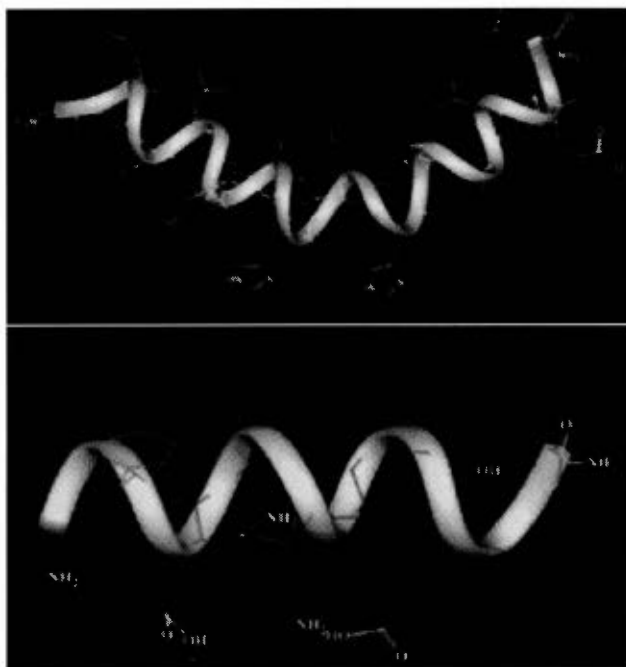


Figure 1.3 Structures de la caérine 1.1 (en haut) et de l'auréine 1.2 (en bas) dans eau : TFE. (Apponyi *et al.*, 2004).

On peut voir que contrairement à leur structure aléatoire en solution aqueuse, les deux peptides se réorganisent en hélice α dans un environnement membranaire (Boland et Separovic, 2006; Pukala *et al.*, 2004). La caérine 1.1 s'organise en deux hélices séparées par une région flexible initiée par une proline (Pro15) (Wegener *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1997). Cette région est importante pour l'activité antimicrobienne car il a été démontré que les prolines facilitent l'orientation des zones hydrophiles et hydrophobes par rapport à la membrane (Boland et Separovic, 2006; Pukala *et al.*, 2004).

1.3.2 Activité antimicrobienne

L'auréine 1.2 et la caérine 1.1 sont parmi les peptides les plus actifs contre les bactéries, les champignons et les cellules cancéreuses (Kamysz *et al.*, 2006; Rozek *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 1999). Les travaux menés par Apponyi *et al.* afin de mesurer la concentration minimale inhibitrice de ces peptides contre de nombreuses souches bactériennes montrent que les deux peptides sont actifs contre plusieurs espèces de bactéries Gram- et spécifiquement contre les Gram+ (Apponyi *et al.*, 2004). Cette activité antimicrobienne résulte principalement de l'interaction des peptides avec la membrane bactérienne. À titre d'exemple, la perturbation des membranes par l'auréine 1.2 a été mise en évidence par des marqueurs fluorescents incorporés dans la membrane (Ambroggio *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010).

En ce qui concerne leur mécanisme d'action, plusieurs études et particulièrement celles du groupe de Separovic en Australie (Fernandez *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2013) suggèrent que l'interaction de l'auréine 1.2 se fait à la surface membranaire et que cette interaction provoque la lyse membranaire, ce qui est compatible avec le mécanisme en tapis. Ceci a été appuyé par plusieurs techniques telles que la microscopie à force atomique avec laquelle il a été observé que la surface membranaire devenait plus rugueuse avec l'interaction de l'auréine 1.2 et que celle-ci n'est pas capable de former des pores même à des concentrations qui provoquent sa lyse (Fernandez *et al.*, 2012).

De plus, des analyses par résonance magnétique nucléaire du phosphore (RMN- ^{31}P) et du deutérium (^2H) ont montré plus d'effet lipidique de l'auréine 1.2 sur la région supérieure de la chaîne acyle que sur la région inférieure (Fernandez *et al.*, 2012) indiquant qu'elle reste à la surface de la bicouche.

En ce qui concerne la caérine 1.1, des analyses en RMN- ^{31}P ont montré que son interaction avec les membranes provoque le désordre au niveau inférieur des chaînes acyle et au niveau des têtes polaires des lipides mais qu'elle provoque de l'ordre dans la région supérieure de la chaîne acyle, ce qui suggère une interaction de la caérine 1.1 avec toutes les régions des phospholipides due à son insertion dans la bicouche membranaire (Fernandez *et al.*, 2013; Marcotte *et al.*, 2003). De plus, ces résultats ont montré une formation d'un mélange de lipides en phases fluide et gel (Fernandez *et al.*, 2013), révélant une déformation de la bicouche et suggérant que la caérine 1.1 agit par le modèle des pores toroïdaux et non celui des douves de tonneaux. Ces deux modèles seront détaillés dans la section 1.5.

Ces travaux ont été la source d'une hypothèse générale sur la relation de la taille des peptides avec leur mécanisme d'action. En effet, tout AMP composé de plus de 20 acides aminés est capable d'internaliser la bicouche lipidique en formant des pores transmembranaires alors que les peptides composés de moins de 20 acides aminés possèdent en général un mécanisme semblable aux détergents, nommé en tapis. Cependant, certains peptides plus courts que 20 acides aminés ne possèdent pas un mécanisme d'action semblable aux détergents, soit le mécanisme en tapis tel que les peptides 14-mères forment des pores toroïdaux transitoires (Ouellet *et al.*, 2007). Il est important de souligner que ces travaux ont été réalisées avec des bicouches phospholipidiques, composées généralement par DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) ou de DMPC/DMPG (dimyristoylphosphatidylglycérol) (Boland et Separovic, 2006; Fernandez *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2013). Ces membranes modèles sont plus détaillées dans ce qui suit.

1.4 Bactéries

1.4.1 Membranes/parois bactériennes

Les membranes bactériennes sont caractérisées par une structure complexe à plusieurs couches qui protègent les organismes de l'environnement hostile et permet aux éléments nutritifs de pénétrer dans la cellule. Tel que présenté dans la Figure 1.4, les enveloppes cellulaires des bactéries se séparent en deux groupes, Gram+ et Gram-, selon la structure de leurs membranes. Elles sont toutes les deux composées d'une membrane plasmique interne, mais diffèrent par leurs parois. L'un des constituants commun de la paroi est le peptidoglycane qui forme un réseau autour de la membrane plasmique. Le peptidoglycane schématisé dans la Figure 1.5 est formé par des chaînes répétitives composées d'une partie glucidique composée de N-Acétyl-Glucosamine (NAG) et d'acide N-Acétyl-Muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques β 1-4 et d'une partie peptidique où chaque NAM est lié à un tétrapeptide (Vollmer, 2008). Dans ce projet on s'intéresse à *Escherichia coli* (Gram -) et à *Bacillus subtilis* (Gram+), deux modèles avec lesquels il est intéressant d'étudier *in vivo* les interactions des AMPs afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

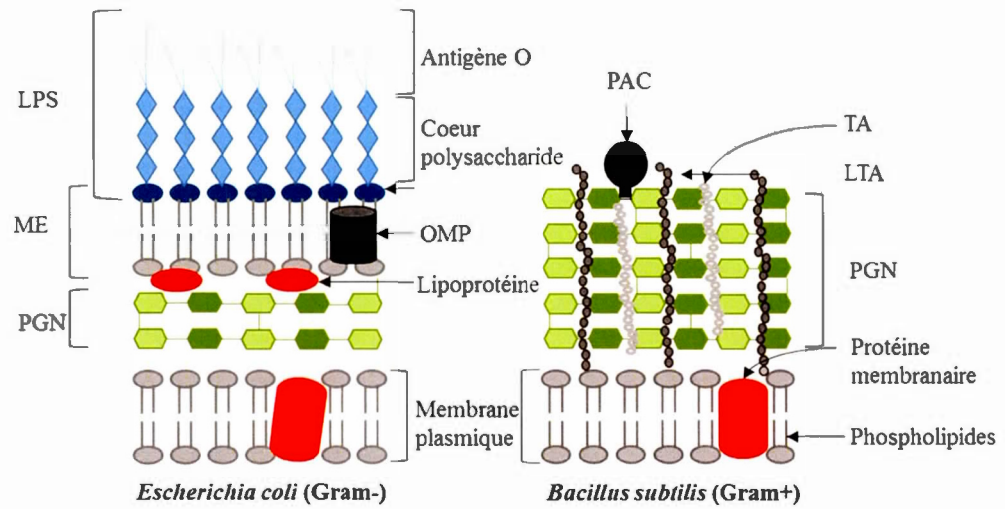


Figure 1.4 Enveloppes des bactéries à Gram- et Gram+. LPS : lipopolysaccharides, ME : membrane externe, PGN : peptidoglycane, OMP : protéine de la membrane externe (*Outer membrane protein*), PAC : protéine attachée de façon covalente, TA : acide téichoïque, LTA : acide lipotéichoïque.

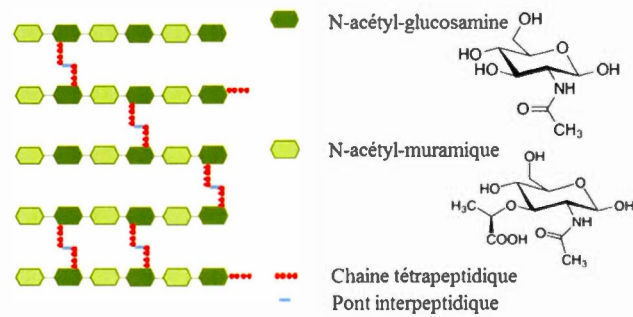


Figure 1.5 Schématisation de la structure du peptidoglycane.

1.4.1.1 *Escherichia coli*

Comme exemple représentatif des bactéries à Gram -, on s'intéresse à l'étude d'*Escherichia coli* (*E. coli*), une bactérie présente dans la flore intestinale de l'homme et d'autres mammifères. Certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes et causent des infections intra et extra- intestinales (Bélanger *et al.*, 2011). La paroi d'*E. coli* représentée à la Figure 1.4 est composée de deux bicouches lipidiques séparées par un espace périplasmique constitué d'une fine couche de peptidoglycane. Des lipoprotéines dites « de Braun » relient le peptidoglycane à la membrane externe. La bicouche externe d'*E. coli* est constituée de glycolipides et principalement de lipopolysaccharides (LPS) chargés négativement (Kamio et Nikaido, 1976). Une moitié des LPS correspond à une partie lipidique hydrophobe, appelée le lipide A et responsable du pouvoir toxique, tandis que l'autre partie consiste en une chaîne O spécifique qui correspond à un polysaccharide responsable de la reconnaissance antigénique et de l'antigénicité (Figure 1.6). Des protéines transmembranaires sont également associées à la membrane externe, telles que les porines (Raetz *et al.*, 2007). En ce qui concerne les phospholipides, *E. coli* est composée de trois principaux types de têtes polaires (Tableau 1.3), soit la PE, la PG et la cardiolipine (CL) et de trois chaînes d'acides gras (C16, C17, C18) (Esfahani *et al.*, 1969).

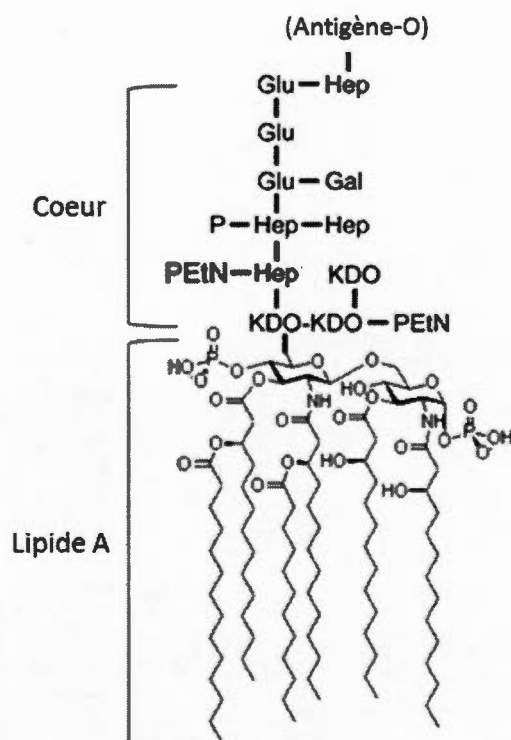


Figure 1.6 Structure de lipopolysaccharides d'*E. coli*. Kdo, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; Glu, D-glucose; Gal, D-galactose; EtN, ethanolamine; P, phosphate (Ruiz *et al.*, 2009).

Tableau 1.3 Composition phospholipidique d'*E. coli* et *B. subtilis*. (Bishop *et al.*, 1967; Clejan *et al.*, 1986; Esfahani *et al.*, 1969)

Bactéries	% lipides totaux		
	PE	PG	CL
<i>E. coli</i>	75	20	5
<i>B. subtilis</i>	34	60	6

1.4.1.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) représentative des bactéries de Gram (+) se trouve principalement dans le sol. Comme *E. coli*, elle est considérée non pathogène pour l'homme mais peut causer des intoxications alimentaires. La première différence entre les parois bactériennes à Gram- et Gram+, mise en évidence dans la Figure 1.4, correspond à l'absence de la membrane externe chez *B. subtilis*. De plus, le peptidoglycane est bien plus épais, d'environ 50 nm chez *B. subtilis* (et pouvant aller jusqu'à 80 nm dans d'autres bactéries à Gram+), par rapport à quelques nanomètres chez les bactéries à Gram- (Hayhurst *et al.*, 2008). Le peptidoglycane est riche en deux types d'acides téichoïques. Il existe des acides téichoïques liés de manière covalente au peptidoglycane par le biais de l'hydroxyle C6 du NAM (TA) et d'autres ancrés à la membrane plasmique, appelés acides lipotéichoïques (LTA) (Percy et Gründling, 2014). Les TA et les LTA (Figure 1.7) sont chargés négativement, et comme les LPS, peuvent être la cible des AMPs par interactions électrostatiques avec les acides aminés chargés positivement (Bucki et Janmey, 2006).

Tel que montré dans le Tableau 1.3, la membrane plasmique de *B. subtilis* contient de la PG, de la PE et de la CL, avec des chaînes acyles en C15, C16 et C17 (Bishop *et al.*, 1967; Clejan *et al.*, 1986).

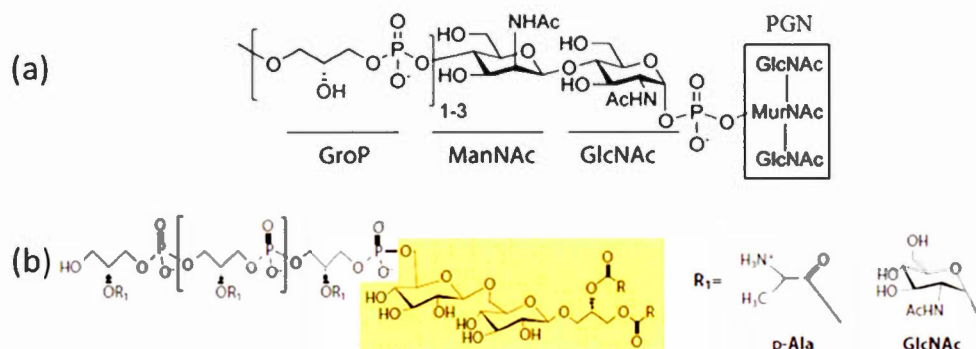


Figure 1.7 Structure des acides téichoïques (TA) composés de GroP-ManNAc-GlcNAc et liés d'une façon covalente au peptidoglycane (PGN) (a) et celle des acides lipotéichoïques (LTA) de *B. subtilis*, composés de TA liés à un diglycéride par une liaison ester (b). R indique les acides gras. (Brown *et al.*, 2013; Percy et Gründling, 2014).

1.4.2 Membranes modèles

Comme mentionné dans la partie précédente, les membranes bactériennes possèdent une structure complexe. Afin d'étudier les interactions des peptides avec la bicouche lipidique, mimer les bicouches lipidiques naturelles en modélisant par des systèmes plus simples est souvent nécessaire en particulier en RMN. Les membranes naturelles étant principalement composées de phospholipides, ces derniers sont utilisés dans les membranes modèles. Les vésicules multilamellaires sont le plus souvent employées et elles sont représentées dans la Figure 1.8 qui illustre différentes organisations possibles des phospholipides en milieux aqueux. Appelées aussi liposomes, elles représentent un assemblage de plusieurs bicouches superposées. Par une technique d'extrusion, on obtient à partir de ces liposomes des vésiculaires unilamellaires de taille unique. Tel que montré dans la Figure 1.9, les phospholipides les plus couramment employés pour mimer les membranes bactériennes sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylglycérol (PG). La PC et la PE portent à la fois une charge positive et

négative, ils sont donc des phospholipides zwitterioniques, et la PG correspond à des phospholipides anioniques abondants dans les membranes bactériennes.

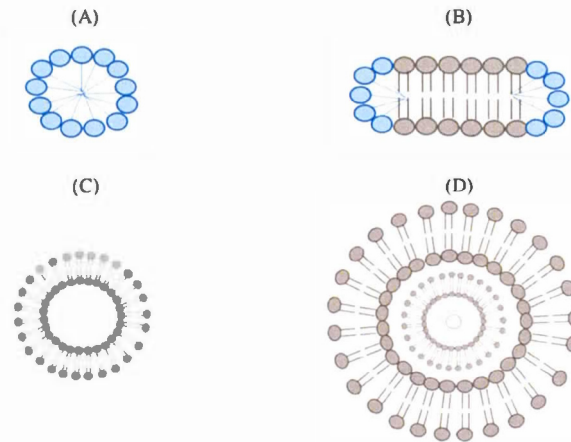


Figure 1.8 Organisation des phospholipides en milieux aqueux. (A) Micelle, (B) Bicelle, (C) Vésicule unilamellaire et (D) Vésicule multilamellaire (coupe vue de dessus).

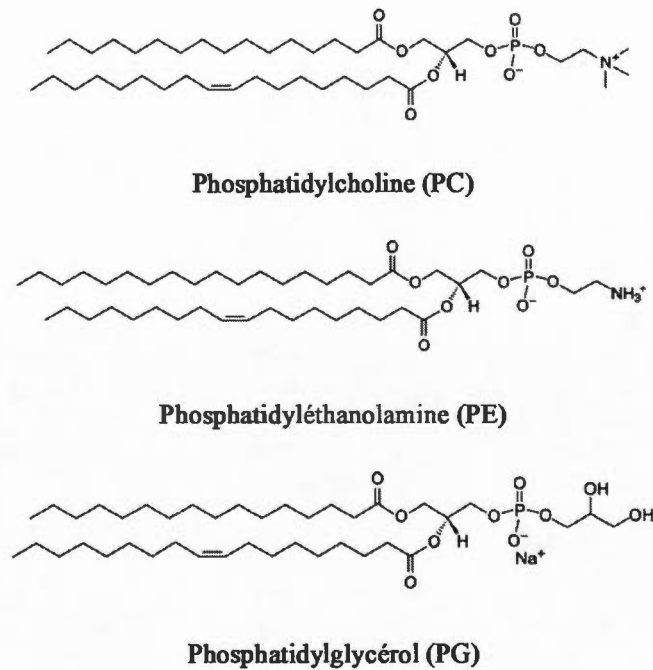


Figure 1.9 Phospholipides courants des membranes modèles bactériennes.

D'autres systèmes de mélanges binaires de lipides ont été adaptés. Les membranes des bactéries étant généralement composées d'un mélange de phospholipides saturés et insaturés, les phospholipides à chaînes palmitoyl-oléoyl (PO) présentés dans la Figure 1.6 possèdent une insaturation cis au milieu de la chaîne oléoyl (18 :1 cis-9) qui augmente la fluidité membranaire et assure la phase fluide des membranes, semblable à celle des bactéries. Les mélanges binaires qui miment les modèles des bactéries à Gram- et Gram+ sont présentés dans la Figure 1.10.

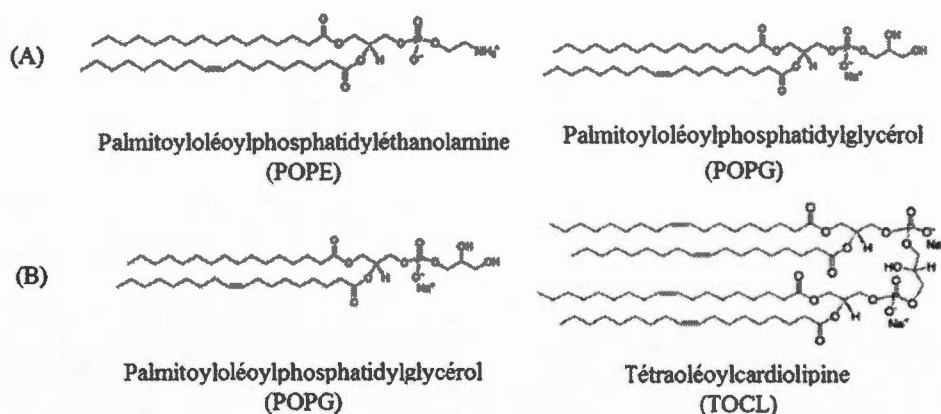


Figure 1.10 Mélanges lipidiques courants des membranes modèles. (A) Modèle de bactérie Gram⁻. (B) Modèle de bactérie Gram⁺.

1.5 Mécanisme d'action membranaire des AMPs

Le mécanisme d'action membranaire des AMPs dépend de l'interaction des peptides avec la membrane pathogène. Cette attraction initiale se fait par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre le peptide cationique et les phospholipides chargés négativement chez les bactéries à Gram⁻ et entre le peptide et les composants du peptidoglycane chez les bactéries à Gram⁺ (Jenssen *et al.*, 2006; Michel, 2010). Ensuite, les peptides se fixent sur les groupements phosphates des membranes externes. Cette interaction peptide/membrane provoque une modification de la structure membranaire et une déstabilisation des lipides qui aboutissent à la perméabilité membranaire.

Trois modèles d'insertion sont détaillés ci-dessous.

1.5.1 Déstabilisation membranaire en tapis (*carpet-like mechanism*)

Par interactions électrostatiques, les peptides s'assemblent à la surface de la membrane en formant un tapis (Shai et Oren, 2001). Ils sont en contact avec les têtes polaires des lipides mais ne s'insèrent pas dans le cœur hydrophobe de la membrane

(Michel, 2010). Il n'est pas nécessaire que ces peptides adoptent une structure en hélice α , mais leur accumulation jusqu'à une concentration élevée sur toute la surface membranaire provoque sa rupture et sa dégradation en complexes micellaires (Shai, 1999; Shai et Oren, 2001). Ce mécanisme d'action schématisé sur la Figure 1.11 a été décrit entre autres pour la magainine (Mor *et al.*, 1994) et pour la cathélicidine humaine LL-37 (Oren *et al.*, 1999).

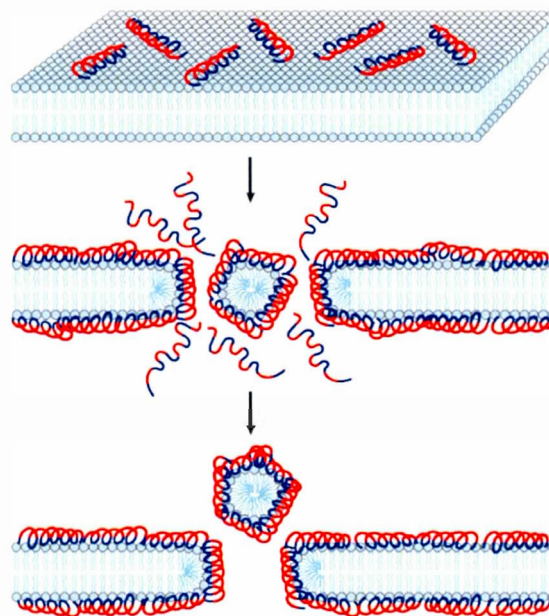


Figure 1.11 Modèle de déstabilisation membranaire en tapis "*carpet like*". (Brogden, 2005), avec permission.

1.5.2 Le modèle des pores en douve de tonneaux (*barrel stave model*)

Les douves de tonneaux expliquent l'organisation des peptides lors de la perméabilisation membranaire (Figure 1.12) (Michel, 2010). Dans ce modèle, les peptides antimicrobiens cationiques en hélice α changent de conformation en s'attachant à la surface membranaire. Ils pénètrent par leurs pôles hydrophobes en

repoussant les phospholipides grâce à leurs propriétés amphiphiles similaires aux détergents, et la région hydrophile compose l'intérieur du pore. La taille du pore dépend du nombre de monomères peptidiques, et la longueur des peptides doit être suffisante pour qu'ils puissent traverser la bicouche lipidique (Andreu *et al.*, 1992). Ceci provoque la fuite du contenu cytoplasmique et la mort des cellules bactériennes. Le peptide antimicrobien alaméthicine est l'un des plus étudiés dans la compréhension de ce mécanisme d'action (Yeaman et Yount, 2003).

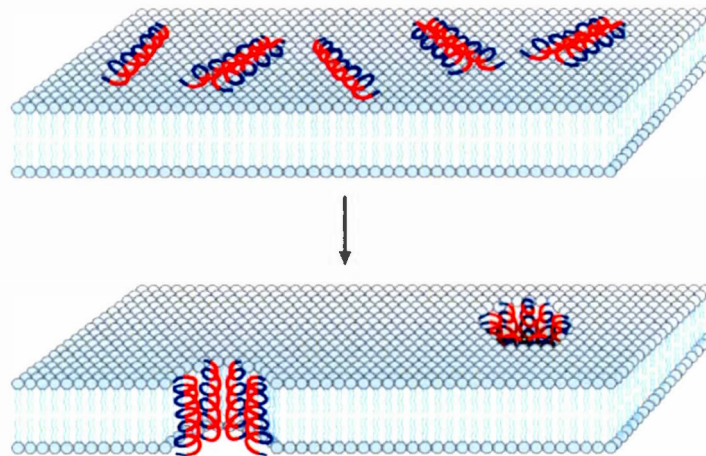


Figure 1.12 Modèle en douves de tonneaux "*barrel stave*". (Broden, 2005), avec permission.

1.5.3 Le modèle des pores toroïdaux (*toroidal-pore*)

Ce modèle ressemble au précédent car les peptides induisent la lyse osmotique de la bactérie par la formation de pores. Les peptides s'assemblent parallèlement à la surface de la membrane puis y sont insérés perpendiculairement (Jenssen *et al.*, 2006; Yeaman et Yount, 2003). Contrairement à l'insertion des peptides sans la déformation de la bicouche lipidique au modèle en douve de tonneaux, dans ce modèle les lipides membranaires sont intercalés avec les peptides dans le canal transmembranaire (Michel, 2010). Ce type de pores transmembranaires présenté à la Figure 1.13 a été décrit pour la méliittine (Yang *et al.*, 2001).

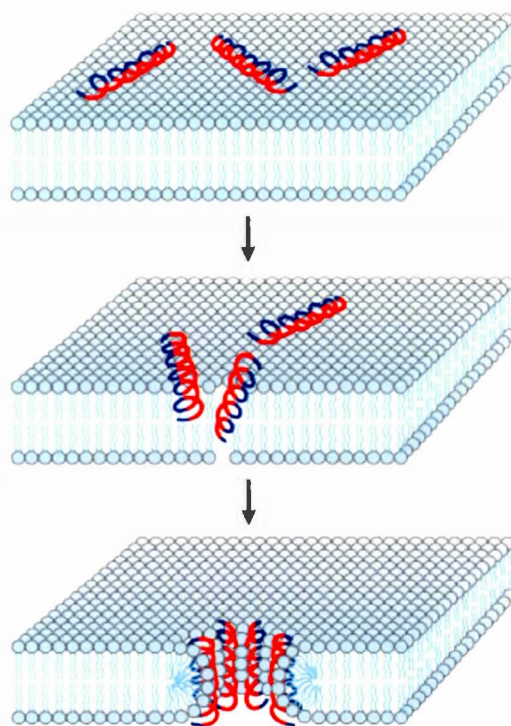


Figure 1.13 Modèle des pores toroïdaux. (Brogden, 2005), avec permission.

1.6 Importance de l'étude des interactions *in vivo*

Tel que mentionné dans la section précédente, les membranes bactériennes sont un milieu très complexe et d'une grande variabilité. Les membranes modèles ne sont donc que des systèmes simplifiés loin de représenter la nature. De plus, la composition membranaire affecte l'orientation, la conformation et la dynamique des peptides. Par exemple, il a été montré que la MSI-78 possède plus d'effet en interaction avec les POPC qu'avec POPE dû à la différence de son orientation et sa conformation (Hallock *et al.*, 2003; Janes, 1996), et que la pardaxine montre un mécanisme d'action semblable aux détergents en interaction avec la POPC mais elle est capable de s'insérer entre les phospholipides de DMPC (Hallock *et al.*, 2002). Étant donné que la composition lipidique affecte l'effet du peptide, il est important d'étudier l'interaction des peptides avec des enveloppes bactériennes intactes. En effet, des études menées sur des

nanoparticules de fullerénol par Brisebois *et al.* ont montré une interaction préférentielle de ces NPs avec DPPG dans des membranes modèles de DPPC/DPPG (Brisebois *et al.*, 2012). Cependant, Tardy-Laporte *et al.* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013) ont soulevé le rôle des LPS dans l'effet du fullerénol sur *E. coli*. L'absence de LPS dans les membranes modèles met en évidence l'importance des études *in vivo*.

1.7 Marquage et étude des bactéries par RMN

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est un outil très puissant utilisé dans de nombreuses branches de la chimie, de la biochimie et des sciences médicales. Dans ce projet, on l'exploite dans un premier temps pour étudier la perturbation des bicouches de phospholipides causée par les peptides antimicrobiens. Ensuite, on l'exploite afin de caractériser l'organisation lipidiques des membranes des bactéries entières. Plusieurs techniques tels que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la microscopie à force atomique ont été développées pour étudier les interactions et pour la caractérisation, mais la RMN présente l'avantage d'être une technique non invasive qui donne des informations au niveau moléculaire.

1.7.1 RMN du deutérium pour l'étude des membranes bactériennes

La RMN du deutérium est utilisé depuis les années 70 avec des membranes modèles et naturelles (Davis *et al.*, 1977; Seelig, 1977; Seelig et Macdonald, 1987). Le ^2H très faiblement représenté naturellement (0,015%), l'enrichissement isotopique est nécessaire et les chaînes lipidiques peuvent être deutérées à une, plusieurs ou toutes les positions hydrogénées, et renseigne sur la dynamique et l'organisation des chaînes acyles au cœur des membranes. Ainsi, par RMN- ^2H , les divers mécanismes d'action des AMPs (décrits dans la section 1.5) en interaction avec des membranes modèles composées de phospholipides ont été étudiés (Apponyi *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2013; Sani et Separovic, 2016).

Afin d'étudier *in vivo* ces mécanismes d'action par RMN- ^2H , plusieurs stratégies de deutération spécifique des membranes bactériennes ont été développées. Dowhan et Bogdanov ont montré qu'il est possible d'intégrer les phospholipides deutérés entiers dans les membranes cellulaires (Dowhan et Bogdanov, 2002), par diffusion des molécules exogènes, fusion de vésicules lipidiques avec les membranes cellulaires ou échange entre les phospholipides membranaires endogènes et les lipides exogènes. Ces méthodes conduisent cependant à de faibles taux de marquage.

Des organismes mutés ont été utilisés pour le marquage tel que les mutants d'*E. coli* (souches L51 et LAS) (Marcotte et Booth, 2014) qui sont auxotrophes en acides gras exogènes (AG) et donc capables d'incorporer les acides gras deutérés tel que l'acide palmitique lors de leur biosynthèse (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011). Mais en 2013, Tardy-Laporte et al. ont montré que le marquage d'une souche sauvage d'*E. coli* est possible par l'incorporation des acides gras exogènes deutérés (Tardy-Laporte *et al.*, 2013), et ceci par leur ajout dans le milieu de culture. En raison du coût énergétique élevé de la biosynthèse des chaînes acyles, il est préférable pour les bactéries d'utiliser les AG exogènes. Ces AG exogènes traversent la membrane d'*E. coli* à l'aide de la protéine fadL transporteuse d'AG. À l'intérieur de la cellule, la quantité d'AG est négligeable car la bactérie les utilise dans la production des phospholipides selon deux mécanismes illustrés à la Figure 1.14. Une proportion majeure des AG exogènes est convertie en acyle-CoA dans le cytoplasme. L'acyle-CoA peut être dégradé par l'acyle-CoA déshydrogénase via une β -oxydation, ou incorporé à l'acide phosphatidique via la glycérol phosphate acyle transférase pour la synthèse de phospholipides (Byers et Shen, 2002; Jiang *et al.*, 2010; Zhang et Rock, 2008). Le second mécanisme concerne les AG libres qui sont couplés à la protéine ACP (*acyl carrier protein*) et conduisent directement à la synthèse de la PE (Byers et Shen, 2002). Ces deux mécanismes assurent ainsi l'incorporation des AG exogènes deutérés dans les phospholipides sans leur élongation ou modification. Il est aussi important de noter que les AG exogènes n'ont pas accès aux chaînes acyles intermédiaires synthétisées par ACP et impliquées

dans la biosynthèse du lipide A (Byers, 1989; Byers et Shen, 2002). Ainsi, les LPS ne peuvent pas être deutérés selon cette méthode.

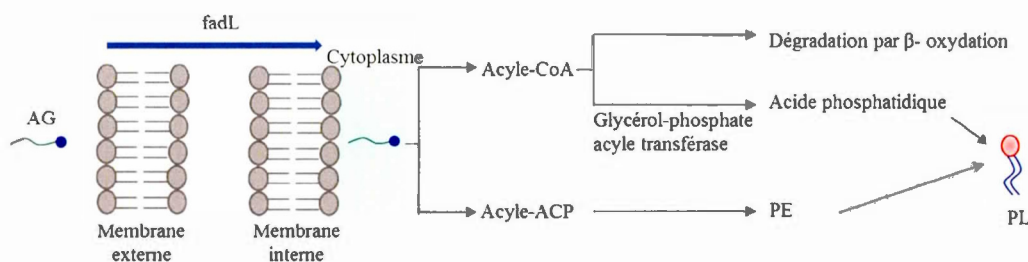


Figure 1.14 Schématisation des principales étapes d'incorporation des acides gras (AG) exogènes dans la biosynthèse des phospholipides (PL) chez *E. coli* sauvage.

Ce marquage présente l'avantage d'atteindre un taux de marquage important (70%) tout en gardant la bactérie intacte (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'incorporation de l'acide palmitique deutéré PA-d₃₁ a affecté le profil lipidique de la bactérie par rapport à la bactérie non marquée avec l'augmentation de la proportion des acides gras saturés, qui affecte la fluidité membranaire. Ainsi, on s'est intéressé dans ce projet à l'optimisation du marquage d'*E. coli*.

De plus, ce marquage a été exploité pour deutérer les phospholipides membranaires de *B. subtilis* sauvage et sera présenté au chapitre IV. Chez *B. subtilis*, la synthèse des LTAs se fait par la production des chaînes PGP (*polyclycerolphosphate*) via l'addition des résidus GroP (glycérolphosphate) en utilisant les PG comme substrat (Percy et Gründling, 2014). Cependant, vu que les LTAs représentent 6-10 mol% dans la bactérie (Koch *et al.*, 1984), et n'utilisent qu'une portion des PG, la proportion des LTAs deutérés doit éventuellement être négligeable.

1.7.2 RMN du carbone pour la caractérisation des bactéries

Plusieurs études utilisant la RMN du ^{13}C à l'état solide ont été menées sur des composants bactériens isolés, purifiés et lyophilisés, mais rares sont celles qui ont été menées sur la caractérisation des bactéries entières. En effet, les précédents travaux du groupe de Simorre ont été réalisés sur les peptidoglycanes de différentes bactéries à Gram- et Gram+ : *E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*, ou encore sur les acides téichoïques (Kern *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2008). D'autres études se sont focalisées sur les lipopolysaccharides et ses constituants (Niedziela *et al.*, 2006; Renault *et al.*, 2012). Mais en 2015, des études de caractérisation de différentes algues entières ont été réalisées par Arnold *et al.* afin d'identifier tous leurs constituants (Arnold *et al.*, 2015). En se basant sur le même objectif, l'intérêt de ce projet est de montrer qu'il est possible de caractériser des bactéries marquées, entières, et vivantes par des analyses en RMN. Pour ce faire, le protocole d'enrichissement isotopique au ^{13}C se base sur l'idée de fournir aux bactéries du glycérol marqué au ^{13}C comme seule source de carbone dans leur milieu de croissance. Il sera détaillé au chapitre V.

1.8 Objectifs

L'objectif général de ce travail était d'étudier par RMN de l'ÉS, les interactions de peptides antimicrobiens avec des bactéries intactes afin de raffiner nos connaissances sur leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. Le premier objectif consistait à marquer, par incorporation d'AG deutérés exogènes, les lipides membranaires d'une souche sauvage d'*E. coli* (Gram-) et de *B. subtilis* (Gram+), deux bactéries qui diffèrent par leurs constituants membranaires dans le but d'étudier les interactions spécifiquement avec les membranes lipidiques. Pour ceci, nous avons exploité la RMN-ÉS du deutérium et la rotation à l'angle magique (MAS). Dans le prochain chapitre, les concepts théoriques de ces techniques ainsi que d'autres méthodes utilisées dans ce projet seront évoquées. Ensuite, tel que mentionné précédemment, étant donné que des travaux antérieurs ont montré que l'ajout de l'acide palmitique

deutéree affecte la proportion des acides gras saturés vs insaturés dans la bactérie non marquée, nous avons optimisé le marquage des bactéries *E. coli* et nous avons caractérisé ses membranes par des expériences en MAS. Les résultats sont présentés dans le troisième chapitre. Une fois la méthode validée et compatible avec les études *in vivo*, les interactions membranaires de la caérine 1.1 et de l'aérine 1.2 ont été étudiées et ces résultats sont présentés au chapitre IV sous la forme d'un article scientifique.

Le second objectif de mon projet était d'enrichir les bactéries *E.coli* et *B.subtilis* au ^{13}C afin d'identifier tous leurs constituants et éventuellement leur réponse lors de l'action des AMPs. La séquence utilisée est décrite dans le chapitre II. Nous avons également développé une stratégie afin de simplifier les spectres et faciliter l'attribution spectrale. Pour ce faire, des lipides et des AGs "froids" (non enrichis en ^{13}C) sont incorporés pendant la croissance des bactéries en présence du glycérol- $^{13}\text{C}_3$ afin d'effacer les signaux des lipides. La méthodologie ainsi que les résultats de ce deuxième objectif sont présentés dans le chapitre V.

CHAPITRE II

ASPECTS THEORIQUES DES METHODES UTILISEES

2.1 RMN de l'état solide pour l'étude des bactéries

Il existe plusieurs interactions entre le spin nucléaire et son environnement. Il s'agit de l'effet Zeeman, l'anisotropie de déplacement chimique, le couplage scalaire, le couplage dipolaire et les interactions quadripolaires. Dans les molécules solides, les mouvements sont lents et plusieurs de ces interactions de nature sensorielle dépendent des différentes orientations et deviennent de nature tensorielle. Les interactions détaillées dans les sections qui suivent sont moyennées en solution deviennent dominantes.

2.1.1 Anisotropie de déplacement chimique

Le déplacement chimique résulte du fait qu'un noyau possède un champ magnétique B_{eff} différent du champ magnétique externe B_0 . La différence entre ces deux champs magnétiques est due aux charges en mouvement autour du noyau qui engendrent des petits champs magnétiques. On appelle ce phénomène l'effet écran du noyau dont la fréquence de résonance sera légèrement inférieure selon l'équation suivante (Macomber, 1998)

$$\omega = \gamma B_0(1 - \sigma) \quad (2.1)$$

avec σ la constante d'écran ou de blindage.

Dans le cas d'un solide, où les mouvements moléculaires sont restreints, chaque orientation possède une fréquence de résonance propre. Ceci se traduit par un spectre large contenant des pics pour chaque fréquence ν de chacune des orientations possibles du noyau. Nous parlons ainsi d'anisotropie de déplacement chimique (ADC) schématisée sur la Figure 2.1

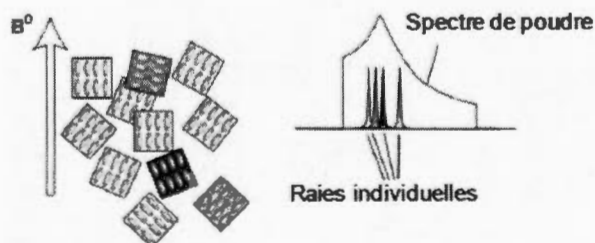


Figure 2.1 Schématisation de l'anisotropie de déplacement chimique en RMN-ÉS et du spectre de poudre qui résulte de toutes les orientations possibles des nuages électroniques (Schmidt et Spiess, 1994), avec permission.

La dépendance orientationnelle de la fréquence de résonance d'un noyau donné est mise en évidence par l'équation 2.2 de la fréquence de résonance pour un spin $\frac{1}{2}$ dans un champ magnétique B_0 (Lichter, 1987)

$$\omega(\alpha, \beta) = \gamma B_0 \left[\delta_{iso} + \delta \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} - \eta \frac{\sin^2 \beta \cos 2\alpha}{2} \right) \right] \quad (2.2)$$

α et β décrivent l'orientation du tenseur d'ADC dans le champ magnétique B_0 , δ_{iso} représente le déplacement chimique isotrope (résonance centrale due à une moyenne de toutes les orientations), δ l'anisotropie de déplacement chimique et η le paramètre d'asymétrie qui décrit la déformation du nuage électronique.

2.1.2 Couplage dipolaire

Le couplage dipolaire correspond à l'interaction entre deux ou plusieurs noyaux voisins à travers l'espace. Cette interaction peut être le résultat d'un couplage homo- ou hétéronucléaire qui se traduit par une séparation de pics sur le spectre. Dans le cas de couplage hétéronucléaire, la fréquence se calcule comme suit (Pochapsky, 2007) :

$$\omega_D = \pm \frac{1}{2} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar \gamma_A \gamma_B}{r_{AB}^3} \left(\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad (2.3)$$

où γ_A et γ_B sont les rapports gyromagnétiques des deux noyaux couplés, r la distance qui les séparent et θ est l'angle entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique externe B_0 (Figure 2.2). Le symbole \pm explique l'existence de deux pics séparés qui conduisent à l'éclatement dipolaire mentionné plus haut.

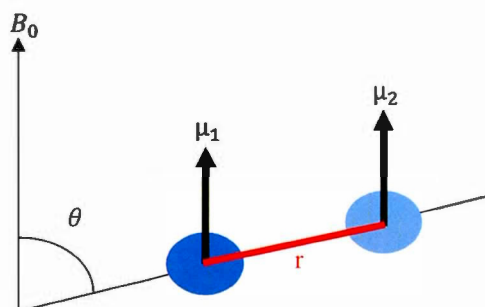


Figure 2.2 Schématisation du couplage dipolaire entre deux moments magnétiques.

La fréquence ω_D dépend ainsi de la distance entre les noyaux, et cette dépendance est largement exploitée par les expériences de RMN afin de déterminer la structure de molécules (Macomber, 1998). De plus, le terme $(3\cos^2\theta-1)$ indique que ω_D dépend de l'orientation des noyaux par rapport à B_0 , mais il est indépendant de la force de B_0 .

Dans les analyses de RMN, on a souvent recours au découplage pour annuler le couplage dipolaire qui est fort dans le cas du proton. Ayant un γ très élevé, la contribution du ^1H est importante (Équation 2.3). Ainsi, le découplage qui consiste à appliquer un champ de radiofréquences constant sur le ^1H dans le cas de l'acquisition du ^{13}C est nécessaire pour éviter le dédoublement des pics, avoir des raies plus fines et améliorer la résolution des spectres. Mais ceci n'est pas nécessaire dans le cas du deutérium (noyau de $\text{spin} \geq 1$) puisque les interactions quadripolaires dominent le spectre (Levitt, 2008).

2.1.3 Interactions quadripolaires

Tout noyau de spin ≥ 1 , comme le deutérium, est appelé noyau quadripolaire. Ces noyaux ont une distribution asymétrique de leurs charges qui crée le moment quadripolaire du noyau. Les gradients de champ électrique (EFG pour *Electric Field Gradient*) sont générés par une distribution également asymétrique des électrons autour du noyau (Levitt, 2008). L'interaction de ces EFG avec le moment quadripolaire induit le couplage quadripolaire qui modifie l'énergie des états de spin tel qu'illustré à la Figure 2.3. Ceci se traduit par le dédoublement de pics sur le spectre pour un spin 1. Un doublet apparait donc à $\nu_0 \pm \Delta\nu/2$ et la distance entre ces doublets, $\Delta\nu_Q$, est appelée écart à éclatement quadripolaire.

Comme montré par l'équation 2.4 (Macomber, 1998), cet écart quadripolaire renseigne sur l'orientation des liaisons C-D dans le cas des lipides deutérés dans des membranes modèles et dépend du paramètre d'ordre S_{CD} (Seelig et Macdonald, 1987). Ce dernier reflète l'angle existant entre le plan des liaisons C-D et le champ magnétique et reflète ainsi l'ordre des liaisons vu qu'il dépend de la structure et de l'orientation de la chaîne acyle.

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (2.4)$$

$$A_Q = \frac{e^2 q Q}{h}$$

avec A_Q la constante de couplage quadripolaire, Q le moment quadripolaire électrique du noyau, q la charge électrique et h la constante de Plank.

Dans le cas du ^2H de spin 1, le spectre théorique d'une membrane marquée à une seule position le long de la chaîne lipidique est illustré à la Figure 2.4. Ce spectre reflète la présence des deux transitions qui peuvent avoir lieu avec ce noyau qui présente trois états de spins $(-1, 0, +1)$, et illustre ainsi deux pics séparés par $\Delta\nu_Q$.

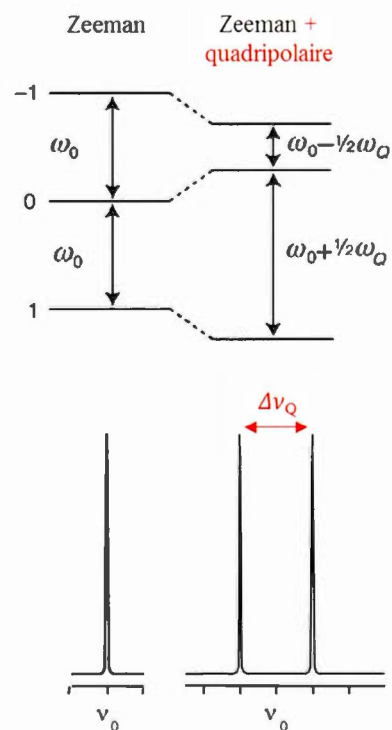


Figure 2.3 Modification des niveaux énergétiques due aux interactions quadrupolaires. Adapté de (Marcotte, 2016)

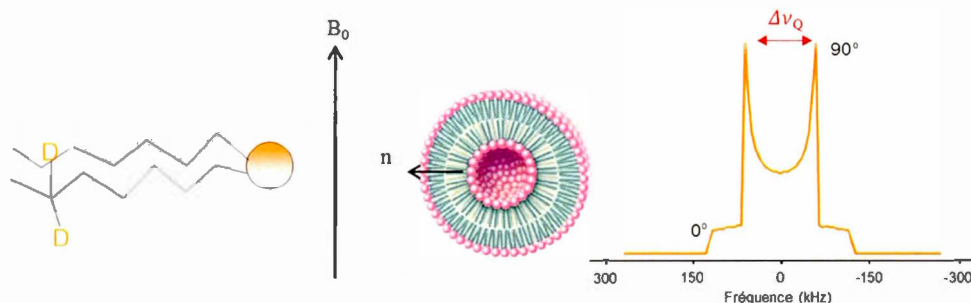


Figure 2.4 Spectre RMN- ^2H statique de vésicules de phospholipides ayant une seule position deutérée le long de la chaîne acyle. Adapté de (Marcotte, 2016).

2.1.4 La rotation à l'angle magique

La rotation à l'angle magique (*magic-angle spinning*, MAS) schématisée à la Figure 2.5 exploite la dépendance en $3\cos^2\theta - 1$ de l'ADC, de l'interaction dipolaire et quadripolaire (Équations 2.2, 2.3 et 2.4). Ces interactions sont maximales pour $\theta = 0^\circ$ et nulles pour $\theta = 54.7^\circ$ (Peersen et Smith, 1993). Quand l'échantillon est orienté à cet angle magique et soumis à une rotation à très haute vitesse ($> 5 \text{ kHz}$), il se produit un effet de moyenne des interactions, tel que démontré par les équations 2.2 et 2.3. Cet effet est optimal quand la vitesse de rotation est supérieure à la fréquence des interactions qui doivent être moyennées. On obtient ainsi des spectres de haute résolution avec des raies isotropes séparées par la fréquence de rotation. Cette technique permet d'améliorer la qualité des spectres avec un gain important en signal sur bruit et en résolution.

Il a été suggéré depuis les années 80 que l'utilisation de la MAS en RMN- ^2H permet d'extraire des informations similaires à celles obtenus en statique (Clayden, 1986). Cette technique a été peu utilisée dans l'étude des membranes biologiques (Glaubitx *et*

al., 1999). Ensuite, avec des expériences sur des membranes modèles composées de 1,2-DPPC- d_{62} , il a été démontré que les informations, y compris la dynamique, en statique et en MAS sont conservées (Warnet *et al.*, 2016). Une fois ces expériences optimisées sur la DPPC (Warnet *et al.*, 2016), il a été intéressant de les appliquer sur des bactéries intactes. En effet, dans le cas de membranes biologiques naturelles, en plus de l'augmentation en résolution, la MAS présente l'avantage de réduire le temps d'analyse et maintenir le caractère *in vivo* des expériences. Cet aspect sera discuté plus en détail au chapitre III.

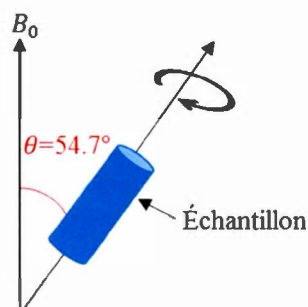


Figure 2.5 Schématisation du principe de la rotation à l'angle magique.

2.2 RMN du deutérium pour l'étude des membranes bactériennes

2.2.1 L'écart quadripolaire et moments spectraux pour l'analyse des spectres de RMN- 2H

Dans le cas des systèmes lipidiques étudiés dans ce projet, ils sont composés de chaînes acyles complètement deutérées. Chaque position des deutérons pour chacune des orientations dans le B_0 se traduit par un écart quadripolaire sur le spectre comme illustré dans le spectre des vésicules multilamellaires en phase fluide dans la Figure 2.6. En bout des chaînes acyles, les mouvements sont maximaux (S_{CD} faible) (Équation 2.4)

et leur $\Delta\nu_Q$ est le plus petit, tandis que le plus grand éclatement correspond à la position des deutérons près de la tête polaire où les mouvements moléculaires sont restreints (S_{CD} élevé).

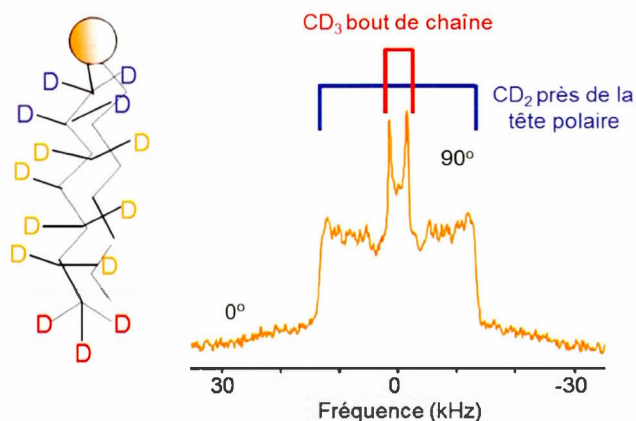


Figure 2.6 Spectre RMN- ^2H statique de vésicules multilamellaires de phospholipides ayant des chaînes acyles entièrement deutérées. Adapté de Marcotte, 2016.

On peut donc extraire le paramètre d'ordre S_{CD} à partir de l'écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$. Mais dans le cas de lipides entièrement deutérés, extraire une valeur exacte de ce paramètre devient impossible avec la superposition de doublets ayant différents $\Delta\nu_Q$. Contrairement à celui des systèmes lipidiques (Figure 2.6), le spectre de RMN- ^2H statique d'une bactérie intacte montre une forme avec des écarts quadripolaires moins bien définis (Figure 2.7). Ainsi, en 1979, Davis et al. ont développé une méthode d'analyse par le calcul des moments spectraux (Davis *et al.*, 1979), appliquée ensuite aux bactéries *E. coli* par (Pius *et al.*, 2011) et (Tardy-Laporte *et al.*, 2013)

Ces moments spectraux décrivent la forme du spectre (équation 2.5) avec $f(\omega)$ correspondant à la forme de raies du spectre et ω la fréquence de rotation.

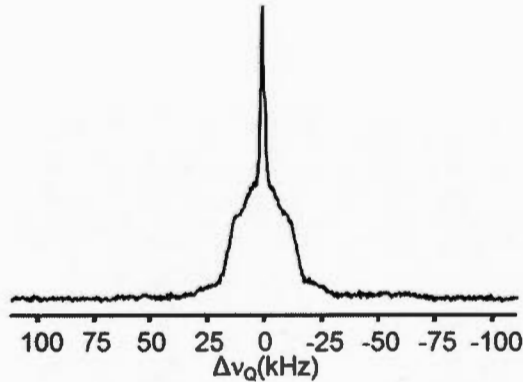


Figure 2.7 Spectre de RMN- ^2H de bactéries *E. coli* (BL21) intactes avec les phospholipides deutérés, analysées *in vivo* à 37 °C (Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

$$M_n = \frac{\int_0^\infty \omega^n f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega} \quad (2.5) \text{ (Davis *et al.*, 1979)}$$

où n est le nombre d'ordre.

M_1 et M_2 sont les 1^{er} et 2nd moments spectraux. Ils permettent d'avoir des informations concernant l'orientation et la dynamique des chaînes acyles membranaires comme illustré dans l'équation suivante (Davis *et al.*, 1979) :

$$M_n = \frac{4\pi^n \nu_Q^n}{5} (S_{CD}^n) \quad (2.6)$$

avec ν_Q l'écart quadripolaire moyen le long de la chaîne acyle.

Dans le cas des expériences en MAS, une deuxième méthode de calcul de moments développée par Maricq et Waugh en 1979 (Maricq et Waugh, 1979) est utilisée

$$M_n = 2 \pi \omega_r^n \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^n A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N} \quad (2.7)$$

avec A_N l'aire de la $N^{\text{ème}}$ bande de rotation et ω_r la fréquence de rotation.

2.2.2 Séquence d'impulsions d'écho solide

Pour obtenir le maximum du signal de précession libre (FID), son acquisition dans un délai court est importante dans le cas du deutérium qui relaxe rapidement suite à son excitation. Dû aux limitations électroniques de l'appareil, les premiers points du FID d'intensité maximale peuvent être ratés et le rapport signal sur bruit diminue, ce qui devient problématique. La séquence d'écho quadripolaire (Davis *et al.*, 1976) corrige les effets du délai car elle assure une refocalisation totale de la magnétisation via une seconde impulsion (90°) et l'appareil a ainsi le temps de détecter le début du FID.

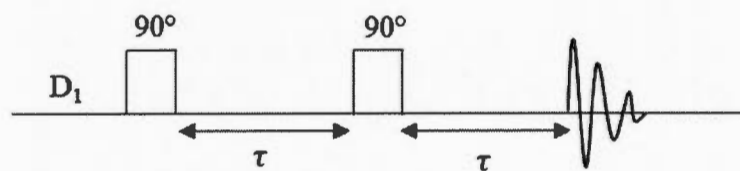


Figure 2.8 Séquence d'impulsions d'écho quadripolaire où D_1 est le délai entre les acquisitions et τ le délai entre les impulsions.

2.2.3 Séquence d'impulsions d'écho de Hahn

Les spectres de RMN- ^2H en MAS sont obtenus par une séquence d'impulsions d'écho de Hahn modifiée (Bloom *et al.*, 1980; Clayden, 1986) avec une première impulsion de 45° au lieu de 90° afin d'élargir le profil d'excitation. Et par l'application d'une seconde impulsion de 180° , il est possible de refocaliser les spins déphasés (par perte de cohérence) et ainsi donner lieu à un signal maximal observable après un temps τ . Le délai τ entre les deux impulsions doit correspondre à un nombre "n" de périodes de rotor, où n est un nombre entier.

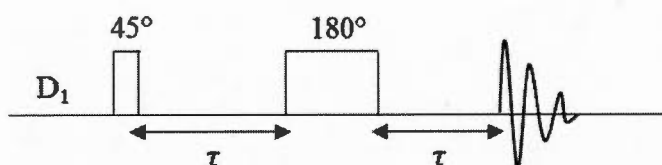


Figure 2.9 Séquence d'impulsions d'écho de Hahn modifiée où D_1 est le délai entre les acquisitions et τ le délai entre les impulsions.

2.3 RMN- ^{13}C pour l'étude des bactéries entières

2.3.1 Impulsion directe

L'impulsion directe (*directe pulse*, DP) est la plus simple séquence en RMN. Il s'agit d'appliquer une impulsion de 90° sur le noyau d'intérêt et faire directement l'acquisition du signal tel que montré sur la Figure 2.10.

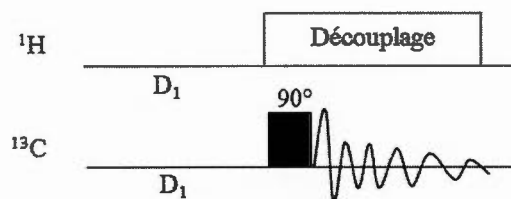


Figure 2.10 Séquence d'impulsions avec excitation directe avec découplage hétéronucléaire.

2.3.2 Le découplage

Dans cette étude, le découplage consiste à appliquer un champ de radiofréquences constant sur le ^1H tel que montré sur la Figure 2.10 pendant l'acquisition du noyau ^{13}C . Ceci élimine le couplage hétéronucléaire ^{13}C - ^1H et il est important car la résolution du spectre en dépend. En effet, l'intensité du signal répartie dans des multiplets se rassemble dans un seul pic, d'où l'amélioration du rapport signal/bruit.

2.3.3 L'effet NOE (*Nuclear Overhauser effect*)

Un découplage à faible puissance produit un effet NOE, une stratégie de transfert de polarisation du ^1H au ^{13}C qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit vu que la sensibilité du signal S dépend du γ (Équation 2.8), et cette augmentation peut être de l'ordre d'un facteur 3. Le NOE est une forme de relaxation nucléaire qui exploite le couplage dipolaire. Tel que montré sur la séquence de la Figure 2.11, la saturation des ^1H se fait avant les impulsions sur le carbone pour que l'effet NOE puisse se mettre en place.

$$S = \gamma^3 B^2 T^{-1} N [I(I + 1)] \quad (2.8)$$

avec N nombre de noyaux (concentration), T la température, et I le spin nucléaire.

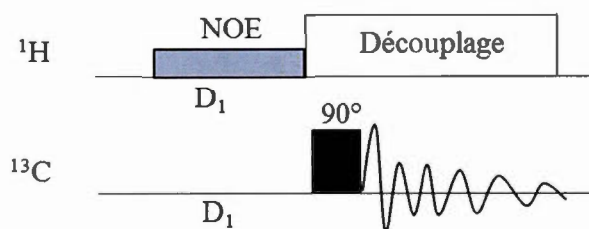


Figure 2.11 Séquence d'impulsions avec excitation directe et découplage hétéronucléaire, employant l'effet NOE.

2.4 Détermination de la viabilité cellulaire

Pendant les analyses de RMN- ^2H , les cellules bactériennes sont privées de nutriments et d'échanges gazeux. Ainsi, des tests de viabilité après les expériences de RMN sont importants afin de vérifier la dégradation des cellules et le maintien du caractère *in vivo* des expériences.

Le test de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium), classiquement utilisé pour évaluer l'activité mitochondriale reflétant la viabilité de cellules eucaryotes, a été adapté aux bactéries (Wang, H. *et al.*, 2010). Le principe de ce test repose sur la conversion du MTT jaune et hydrosoluble en cristaux de formazan violets et insolubles dans l'eau par des succinates déshydrogénases (SDH) mitochondriales chez les cellules vivantes. Cette réaction est illustrée à la Figure 2.10. La quantité de cristaux de formazan produits par les cellules à partir du MTT et dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm.

Cette quantité est directement proportionnelle à l'activité métabolique de l'échantillon cellulaire (Wang, H. *et al.*, 2010).

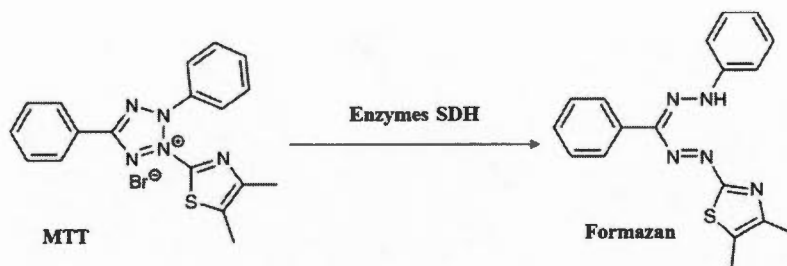


Figure 2.12 Schématisation de la réaction de réduction MTT en cristaux de formazan.

2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice d'AMP

Afin de pouvoir étudier l'interaction d'AMP avec *E. coli* et *B. subtilis*, il est nécessaire de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'AMP à laquelle les bactéries doivent être exposées. La CMI est la plus faible concentration d'antimicrobiens qui permette d'inhiber toute croissance visible d'un organisme après 24h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. Cette concentration permet l'arrêt du développement de la souche mais non sa mort.

Dans ce projet, les CMI de la caérine 1.1 et d'auréine 1.2 ont été évaluées par la technique de micro-dilution en milieu liquide, sur microplaque (Yoshida *et al.*, 2001). Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations décroissantes d'antimicrobiens selon une progression binaire et l'évaluation des CMI se fait par la mesure des densités optiques de chacun des puits.

Leur lecture se fait sous un lecteur d'absorbance de microplaques à une longueur d'onde de 600 nm.

CHAPITRE III

OPTIMISATION DU MARQUAGE DES BACTÉRIES *E. COLI* ET ÉTUDE DE LEURS MEMBRANES EN MAS

Ce chapitre porte sur un projet effectué en collaboration avec le Dr. Dror Warschawski du laboratoire de Biologie Physico-Chimique des Protéines Membranaires (IBPC, CNRS). Le projet consiste à explorer une nouvelle méthode d'analyse en MAS sur des membranes modèles et des membranes bactériennes telle que celles de la souche BL21 d'*E. coli*. Un article soumis à *Biochimica Biophysica Acta* le 14 août 2015 et accepté le 18 septembre 2015 a été le fruit de ce projet et est présenté à l'Annexe A1. Seules les expériences effectuées sur *E. coli* et que j'ai réalisées sont présentées ici. Plus en détail, j'ai effectué les tests de viabilité et du profil lipidique et j'ai réalisé les expériences de RMN avec Alexandre Arnold. Les données de RMN ont ensuite été traitées par Xavier Warnet.

3.1 Introduction et objectifs

La RMN ^2H est une technique intéressante dans l'étude des membranes lipidiques. Les premières applications sur des membranes bactériennes d'*Acholeplasma laidlawii* enrichies en acide gras deutérés remontent aux années 70 (Oldfield *et al.*, 1972; Oldfield *et al.*, 1971). De plus, à la fin des années 70, l'analyse des moments spectraux (section 2.2.2) a été introduite par (Bloom *et al.*, 1978) afin de caractériser la membrane par la détermination d'un paramètre d'ordre moyen. Cette méthode, qui permet d'obtenir des informations structurales et dynamiques, a été

appliquée plus tard dans plusieurs études sur diverses membranes biologiques (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

Le couplage de la rotation à l'angle magique remonte aussi à la fin des années 70 (Ackerman *et al.*, 1979; Maricq et Waugh, 1979), et les études de Clayden (Clayden, 1986) ont montré que la MAS peut préserver les informations structurales et dynamiques contenues dans les spectres en statique. Depuis, l'analyse des bandes de rotation a été utilisée dans la caractérisation des membranes modèles. Des analyses de largeurs des bandes de rotation, des études de fluctuations critiques ainsi que des mesures de temps de relaxation ont été effectuées par la RMN du ^2H avec MAS (Davis *et al.*, 2013; Radhakrishnan et McConnell, 2007; Veatch *et al.*, 2007). La MAS n'a pourtant pas été utilisée sur des cellules intactes. Ainsi, dans un premier temps, on s'est intéressé, dans ce projet, à la comparaison des spectres statiques et en MAS à 5 et 10 kHz obtenus sur des membranes modèles de DPPC- d_{62} à différentes températures (article en Annexe A1). Les résultats obtenus ont montré que dans le cas de la MAS à 10 kHz, il est possible d'observer la transition de phase et que les valeurs de moments spectraux sont cohérentes avec des études précédentes (Davis *et al.*, 1979). Une fois les informations obtenues, l'objectif de ce volet était d'appliquer cette méthode sur des cellules intactes d'*E. coli* sauvage. Cependant, avant d'analyser ces membranes, tel que mentionné dans la section 1.7.1, notre objectif initial était d'optimiser le marquage d'*E. coli*. Pour ce faire, des cellules cultivées dans deux conditions différentes ont été analysées par GC-MS, et par RMN en statique et en MAS.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel

La dodécylphosphocoline (DPC) a été achetée d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). L'acide palmitique deutéré (PA- d_{31}), l'acide oléique (OA), l'eau sans deutérium (*deuterium depleted water*), et le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-

diphényltetrazolium bromide (MTT) proviennent de Sigma Aldrich (Saint Louis, MI, USA).

3.2.2 Préparation des échantillons

La croissance des cellules bactériennes d'*E. coli* (BL21) se fait dans un milieu LB à 37 °C en présence de 0.19 mM de PA-d₃₁ incorporé dans des micelles de DPC. Tel que décrit dans l'étude de Tardy-Laporte et al. (Tardy-Laporte *et al.*, 2013), cette incorporation se fait par chauffage du mélange à une température de 95 °C afin de dissoudre le PA-d₃₁ suivie de trois cycles de gel/dégel. Avec les mêmes étapes de préparation et dans les mêmes conditions, une autre culture d'*E. coli* a été préparée avec l'ajout de 0.19 mM d'OA au PA-d₃₁. Les cellules d'*E. coli* (avec et sans ajout d'acide oléique) sont prélevées à la moitié de la phase exponentielle ($D_{600nm} = 0.4$), lavées deux fois avec une solution saline (NaCl 100 mM) et une fois avec une solution saline dépourvue en ²H afin d'éliminer les signaux provenant des deutérons contenus naturellement dans l'eau. Les culots des bactéries sont ensuite insérés dans des rotors de 4 mm et analysés par la RMN ²H.

3.2.3 Analyse du profil lipidique par GC-MS

Les lipides des cellules d'*E. coli* dans les deux conditions de culture ainsi que ceux d'*E. coli* non marquée sont extraits via la méthode de Folch légèrement modifiée (Folch *et al.*, 1957). Un mélange de chloroforme et méthanol (2/1, v/v) et 0,88% KCl est ajouté aux culots bactériens et les phases organiques sont récupérées et évaporées sous flux d'azote à 40 °C. Deux lavages avec chloroforme et méthanol (2/1, v/v) sont effectués sur les lipides extraits qui sont par la suite déposés sur une colonne de silice afin de séparer les lipides polaires (~ 4 cm de silice pour 10 mg de lipides). La silice est hydratée à 6% et conditionnée par le méthanol (10 mL) et le chloroforme (10 mL) avant utilisation. Les lipides neutres sont élués par 10 mL de chloroforme et les phospholipides sont récupérés avec 20 mL de MeOH (Marty *et al.*, 1992). Ces lipides polaires sont évaporés sous flux d'azote à 40 °C et transestérifiés dans un mélange de

2 mL d'acide sulfurique H_2SO_4 (2% en méthanol) et 0,8 mL de toluène pendant 10 minutes à 100 °C. Ils sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) avec détection par spectrométrie de masse (MS) (*Trace GC Ultra, ThermoScientific, Asheville, NC, USA*) tel que détaillé dans l'étude de (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Ces analyses sont effectuées en triplicata pour chaque condition de culture.

3.2.4 Expériences de RMN

Toutes les expériences de RMN ont été effectuées à température ambiante sur un spectromètre Bruker Avance III-HD de 400 MHz (Milton, Ontario, Canada) équipé de sondes MAS (4 ou 1.9 mm).

Les spectres statiques ont été obtenus à l'aide de la séquence d'impulsion écho-solide détaillée dans la section 2.2.3 avec des temps d'écho allant de 40 à 60 μs . L'échantillonnage a été effectué avec 10 k points pendant 0.5 μs chacun et avec un délai de recyclage de 500 ms. Les spectres ont été traités en utilisant 2000 points, suivi d'une correction automatique de la ligne de base et une multiplication exponentielle (*line broadening*) de 20 Hz a été appliquée.

En ce qui concerne les expériences en MAS, elles ont été effectuées à 10 kHz avec une séquence d'impulsion d'écho de Hahn modifiée présentée dans la section 2.2.4. Un total de 128 k points ont été acquis avec un délai d'échantillonnage de 1 μs et un délai de recyclage de 500 ms, ce qui équivaut à 2000 scans (20 min). Les spectres ont été traités en utilisant 64 k points, suivi d'une correction automatique de la ligne de base et une multiplication exponentielle de 20 Hz a été appliquée comme dans le cas des spectres statiques.

3.2.5 Analyse de la viabilité cellulaire

En utilisant le test de réduction du MTT (principe détaillé dans la section 2.4) et le même protocole décrit dans la section 4.4.4, la viabilité cellulaire a été déterminée pour les échantillons après les expériences de RMN en statique et en MAS en triplicata.

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Optimisation du marquage en ^2H des phospholipides membranaires d' *E. coli*

Tel que mentionné précédemment à la section 1.7.1, le marquage des cellules entières d' *E. coli* a été réalisé par la culture de ces dernières en présence de PA- d_{31} . Cependant une étude précédente dans notre laboratoire a montré que l'utilisation seule de l'acide palmitique a modifié le profil lipidique des bactéries non marquées (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Cette modification se manifeste par la diminution du pourcentage des chaînes d'AG insaturés C16 :1 (acide palmitoléique) et C18 :1 (acide oléique), allant de 28% à 9% et de 33% à 7%, respectivement. Bien que les spectres d' *E. coli* (PA- d_{31} seule), réalisés à 37 °C, ont montré que leur membrane est fluide, la modification du profil membranaire devrait provoquer un changement de la fluidité des lipides membranaires, ou de leur température de transition.

Ainsi, comme alternative, nous avons cultivé *E. coli* en présence de PA- d_{31} et de l'acide oléique protoné C18 :1. L'analyse du profil en acides gras des bactéries non marquées, cultivées en présence de PA- d_{31} , et en présence combinée de PA- d_{31} et OA sont montrés dans le Tableau 3.1. Ce dernier montre qu'en présence de PA- d_{31} seul, le rapport des acides gras saturés et insaturés (S/I) est déséquilibré mais l'ajout de l'OA le rétablit pour se rapprocher du rapport (S/I) des bactéries entières non marquées.

De plus, il est important de noter que la diminution de la proportion de C16:0 (55 à 45%) et l'augmentation de celle d'OA (14 à 23%) ne réduit que légèrement le pourcentage de deutération. L'ajout de l'OA devrait avoir un effet minime sur la sensibilité au niveau des spectres RMN du ^2H .

Tableau 3.1 Composition en acides gras d'*E. coli* en fonction de différentes conditions de culture, déterminées par GC-MS

	Non marquée	<i>E. coli</i> + PA-d ₃₁	<i>E. coli</i> + PA-d ₃₁ + OA
C14:0	2%	1%	1%
C15:1	5%	5%	0%
C16:0	39%	55% (69% deutérés)	45% (67% deutérés)
C16:1	1%	3%	6%
cyC17:0	13%	11%	14%
C18:0	2%	2%	1%
C18:1	31%	14%	23%
C19:0	2%	1%	2%
Autres AG	5%	9%	8%
AG saturés	48%	60%	51%
AG insaturés	52%	40%	49%

3.3.2 Caractérisation d'*E. coli*

En premier lieu, nous avons exploité la MAS sur les bactéries entières. Des spectres statiques en ²H ont été comparés à des spectres en MAS à 10 kHz, tous réalisés sur des cellules d'*E. coli* cultivées en présence de PA- d₃₁ (Figure 3.1) et en présence de PA-d₃₁ et OA (Figure 3.2). Ces figures mettent en évidence que la MAS permet d'améliorer le rapport signal sur bruit et d'obtenir des spectres plus rapidement (30 minutes au lieu de trois heures pour un spectre).

La MAS présente ainsi l'avantage d'assurer moins de risque de dégradation des échantillons biologiques pendant les longs temps d'acquisition. Mais, afin de vérifier si la rotation à 10 kHz affecte la viabilité cellulaire, des mesures ont été effectuées après

1h, 3h et 15h d'expériences de RMN en MAS et statique. Les résultats obtenus (Tableau 3.2) montrent que la MAS n'a pas d'effet majeur sur la viabilité d'*E. coli*. Par contre, ces résultats confirment que plus le temps d'acquisition est long, plus les bactéries se dégradent. Ainsi, tel que mentionné plus haut, en plus du gain en sensibilité, l'utilisation de la MAS peut devenir essentielle dans les analyses des échantillons biologiques pour assurer le caractère *in vivo* des expériences.

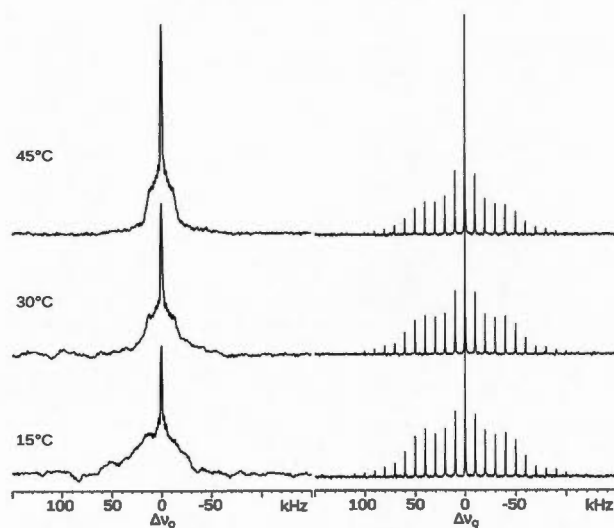


Figure 3.1 Spectres statiques et MAS (à 10 kHz) en ^2H de cellules entières d' *E. coli* cultivées en présence de PA- d_{31} à différentes températures (15, 30 et 45 °C). Les spectres statiques sont obtenus avec 20 k scans (3 heures) et les spectres en MAS avec 2 k scans (20 minutes).

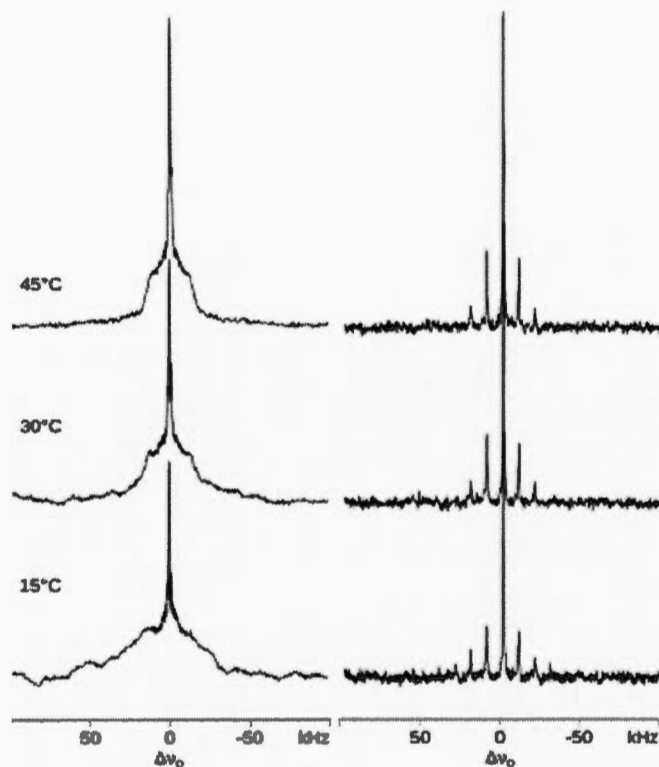


Figure 3.2 Spectres statiques et MAS (à 10 kHz) en ^2H de cellules entières d'*E. coli* cultivées en présence de PA- d_{31} et d'OA protoné à différentes températures (15, 30 et 45 °C). Les spectres statiques sont obtenus avec 20 k scans (3 heures) et les spectres en MAS avec 2 k scans (20 minutes).

Tableau 3.2 Pourcentage de cellules survivantes (cultivées en présence d'acide palmitique deutéré) avec ou sans rotation à l'angle magique à 10 kHz. Ces pourcentages ont été déterminés par des tests d'activité de réduction du MTT.

Temps (h)	Échantillons en statique	Échantillons en MAS
1h	$70 \pm 10 \%$	$67 \pm 4 \%$
3h	$53 \pm 12 \%$	$51 \pm 6 \%$
15h	$40 \pm 7 \%$	$31 \pm 5 \%$

En ce qui concerne la différence des conditions de culture testées sur les bactéries entières d'*E. coli*, on observe sur les Figures 3.1 et 3.2 que les bactéries cultivées en présence de PA-d₃₁ et d'OA donnent des spectres en MAS plus fins avec moins de bandes de rotation que celles cultivées en présence de PA-d₃₁ seulement. Cette observation indique l'augmentation des mouvements des chaînes lipidiques membranaires. De la même façon que pour les membranes modèles de DPPC (Annexe A.1), à partir des spectres en MAS, les calculs de moments spectraux ont été réalisés. Les résultats obtenus (Figure 3.3) confirment les différences de dynamique observées sur les spectres avec la diminution des valeurs de M_2 dans le cas des bactéries cultivées en présence de PA-d₃₁ et OA. De plus, la figure indique que ces bactéries (PA-d₃₁+OA) sont constamment en phase fluide avec relativement pas de changement avec l'augmentation de la température. Cette dernière affecte cependant la phase gel des bactéries cultivées avec PA-d₃₁ avec l'augmentation de la proportion des lipides en phase fluide. Ce résultat est cohérent avec les travaux précédents de (Morein *et al.*, 1996) qui montrent que les membranes biologiques naturelles se trouvent en phase fluide. La RMN confirme ainsi notre hypothèse de la restauration de la dynamique des lipides des bactéries *E. coli* sauvages compatible avec les résultats du profil lipidique obtenu par GC-MS (Tableau 3.1).

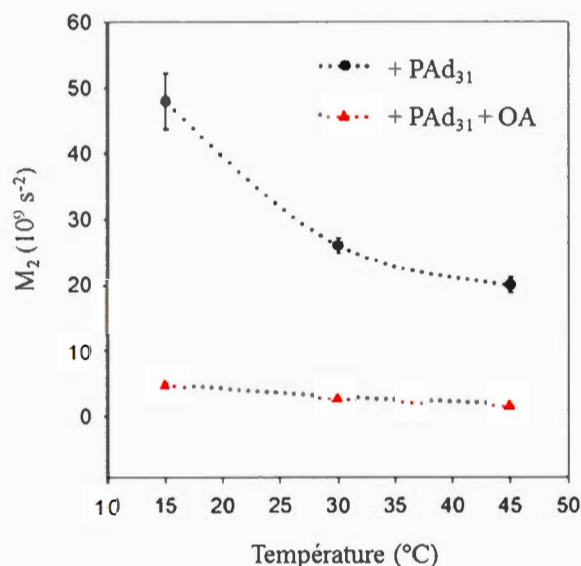


Figure 3.3 Valeurs de moments spectraux M_2 calculés à partir des spectres en MAS à 10 kHz d'*E. coli* cultivées en présence de PA-d₃₁ (en noir) en présence de PA- d₃₁ +OA (en rouge).

3.4 Conclusion

L'utilisation de la MAS a permis d'étudier le comportement dynamique des chaînes lipidiques des membranes bactériennes d'*E. coli* avec un gain en sensibilité important conduisant à un gain en temps d'acquisition. De plus, cette méthode combinée au calcul des moments spectraux a permis ensuite de confirmer l'importance de l'ajout d'AG insaturés (OA) afin de restaurer le profil lipidique sauvage d'*E. coli* et sa fluidité membranaire.

Au-delà de la caractérisation membranaire d'*E. coli* à différentes températures et conditions de culture, cette approche a été explorée dans le chapitre suivant afin d'étudier les interactions de peptides antimicrobiens avec la membrane d'*E. coli* ainsi que celle de *B. subtilis* (Gram+).

CHAPITRE IV

INTERACTION OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES CAERIN 1.1 AND AUREIN 1.2 WITH INTACT BACTERIA BY ^2H SOLID-STATE NMR

Marwa Laadhari¹, Alexandre A. Arnold¹, Andrée E. Gravel¹, Frances Separovic² and
Isabelle Marcotte^{1*}, *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (2016) 2959–2964.

¹Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal,

P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, Canada, H3C 3P8.

²School of Chemistry, Bio21 Institute, University of Melbourne, VIC 3010, Australia

Cet article a été publié dans le journal scientifique *Biochimica Biophysica Acta-Biomembranes*. J'ai effectué toutes les parties expérimentales, y compris le calcul de moments et la rédaction de la première version de l'article. Cependant, la partie expérimentale microbiologique qui inclut l'optimisation du protocole de marquage, les tests MTT et CMI ont été réalisées par moi-même sous la supervision d'Andrée Gravel. J'ai réalisé les analyses de RMN avec la collaboration d'Alexandre Arnold. La rédaction de l'article a été fortement soutenue par les Professeures Isabelle Marcotte et Frances Separovic avec leurs améliorations essentielles dans l'argumentation scientifique et leurs précieuses corrections. La rédaction a été aussi améliorée par les autres coauteurs.

4.1 Résumé

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un excellent outil pour étudier les interactions des agents antimicrobiens avec les membranes bactériennes, généralement sur des membranes modèles. Cependant, considérant la complexité des parois bactériennes, il est intéressant d'étudier les interactions sur des bactéries intactes. Ainsi, notre objectif consiste à étudier l'effet de deux peptides antimicrobiens sur les membranes lipidiques d'*E. coli* et *B. subtilis* intactes par RMN du deutérium (^2H). Plus spécifiquement, nous avons étudié la caérine 1.1 et l'auréine 1.2, deux peptides antimicrobiens isolés de la peau de grenouilles arboricoles australiennes. Pour ce faire, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la caérine 1.1 et de l'auréine 1.2 ont été déterminées par la méthode de dilution sur microplaque, et les valeurs obtenues pour les deux peptides sont de 100 $\mu\text{g/mL}$ et 30 $\mu\text{g/mL}$ pour *E. coli* et *B. subtilis*, respectivement. Ensuite, nous avons établi un protocole de deutération des chaînes phospholipidiques pour les deux bactéries en utilisant l'acide palmitique deutéré, et obtenu un pourcentage de deutération d'environ 67%. L'analyse des moments spectraux en RMN ^2H montre l'interaction des deux peptides avec les régions hydrophobes des membranes bactériennes. En effet, l'addition des peptides diminue l'ordre des chaînes acyles pour *E. coli* et *B. subtilis*, avec un effet plus important de l'auréine 1.2, mais à différentes concentrations peptidiques. Les acides téichoïques et lipotéichoïques anioniques présents dans le peptidoglycane de *B. subtilis* pourraient interagir avec les peptides et diminuer leur concentration locale à la surface de la membrane. En conséquence, une concentration supérieure à la CMI est nécessaire pour exercer leur mécanisme d'action sur *B. subtilis*. Les différences observées entre *E. coli* et *B. subtilis* mettent en évidence l'importance de l'étude du mécanisme d'action avec les bactéries entières. Ce mécanisme dépend de la concentration locale des peptides à la surface membranaire et de l'environnement membranaire. Nos résultats obtenus sont prometteurs pour les étapes à suivre qui consistent à étudier les peptides antimicrobiens en interaction avec les bactéries marquées au ^{13}C , afin de vérifier leur

interaction avec les acides lipotéichoïques et étudier leur interaction avec d'autres constituants cellulaires.

4.2 Abstract

Nuclear magnetic resonance (NMR) is commonly used to probe the effect of antimicrobial agents on bacterial membranes using model membrane systems. Ideally, considering the complexity of membranes, the interaction of molecules with membranes should be studied *in vivo*. The interactions of two antimicrobial peptides (AMPs) with intact *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were investigated using deuterium solid-state NMR. Specifically, we studied caerin 1.1 and aurein 1.2 isolated from the skin of Australian tree frogs. The minimal inhibitory concentration value for *E. coli* and *B. subtilis* was about 100 µg/mL and 30 µg/mL, respectively, for both peptides. A protocol to deuterate the membrane phospholipids of non-mutated *B. subtilis* was established using deuterated palmitic acid. ^2H NMR spectra combined with spectral moment analysis support the interaction of the two AMPs with the hydrophobic core of the bacterial membranes. The presence of peptides decreased the order of the lipid acyl chains for both *E. coli* and *B. subtilis*, but at higher peptide concentrations for the Gram (+) bacteria. This may be explained by the presence of other cell wall components, such as the negatively-charged teichoic and lipoteichoic acids in the peptidoglycan, which would interact with the AMPs and decrease their actual concentration on the membrane surface. The mechanism of action of the AMPs thus depends on their local concentration as well as the membrane environment. The differences between the AMPs interaction with *E. coli* and *B. subtilis* reveal the importance of studying intact bacteria.

Keywords: Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, in-cell NMR, membrane interactions, action mechanism

4.3 Introduction

Excessive use of antibiotics, estimated of about 100,000 t annually, has led to the emergence of pathogen resistance phenomenon (Nikaido, Hiroshi, 2009). This poses risks to hospitals, with 70% of infections in the USA in 2012 caused by bacteria resistant to at least one common antibiotic (Bax et Griffin, 2012), and now dominates the hospital scene (Chang *et al.*, 2015). Bacteria have the ability to quickly develop multidrug resistance, which continues to emerge due to the low production of new antibiotics by pharmaceutical companies (So *et al.*, 2011). Therefore, development of new antimicrobial molecules with novel mechanisms of action is very important, and antimicrobial peptides (AMPs) are promising candidates to fight against infectious diseases (Lorin *et al.*, 2011). These AMPs are of natural source and have been discovered in several organisms such as insects and plants, as well as prokaryotic and eukaryotic cells (Conlon et Sonnevend, 2010; Leippe, 1999; Peters *et al.*, 2010; Radek et Gallo, 2007).

We focus in this study on caerin 1.1 (GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL-NH₂) and aurein 1.2 (GLFDIIKKIAESF-NH₂), two natural AMPs isolated from the skin secretions of the *Litoria* genus of Australian tree frog (Apponyi *et al.*, 2004; Bycroft et Shute, 1985). These two cationic peptides, which exist as random coil in aqueous solution but have α -helical secondary structure in membrane mimetic environments (Boland et Separovic, 2006; Chia *et al.*, 2000), are active against a wide range of Gram-negative and Gram-positive bacteria, especially the latter (Apponyi *et al.*, 2004). The mechanism by which AMPs affect cell viability depends on the peptide sequence (Lee *et al.*, 2014). Previous studies of caerin 1.1 and aurein 1.2 suggest that they act via a transmembrane (Fernandez *et al.*, 2013) and carpet (Fernandez *et al.*, 2012) mechanism, respectively. These studies have exploited phospholipid bilayers, generally composed of DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine) or a lipid mixture of DMPC/DMPG (dimyristoyl-phosphatidylglycerol), but ideally peptide-membrane interactions should be studied in vivo. The structure, dynamics and orientation of

peptides depend on the membrane composition (Hallock *et al.*, 2003) and the envelope of bacteria, which is a very complex system (Silhavy *et al.*, 2010). Gram-negative bacteria have an inner phospholipid membrane, a thin peptidoglycan layer, and an outer membrane mainly composed of lipopolysaccharides (LPS) (Nikaido, H. et Nakae, 1979; Raetz, C. R. et Whitfield, 2002). The LPS are absent in Gram-positive bacteria which do not have an outer membrane, but instead have a thick peptidoglycan layer characterized by the presence of teichoic (TAs) and lipoteichoic acids (LTAs) (Malanovic et Lohner, 2015). On the other hand, *B. subtilis* differ from *E. coli* in phospholipid composition. The membrane of *E. coli* is composed of about 75% phosphatidylethanolamine (PE), 20% phosphatidylglycerol (PG) and 5% cardiolipin (CL) and three fatty acid (C16, C17, C18) chain lengths (Esfahani *et al.*, 1969). The membrane of *B. subtilis* contains 60% PG, 34% PE and 6% CL and mainly C15, C16 and C17 acyl chains (Bishop *et al.*, 1967; Clejan *et al.*, 1986).

Our recently published study of *E. coli* bacteria show an efficient incorporation of perdeuterated exogenous palmitic acid in the membrane phospholipids (Tardy-Laporte *et al.*, 2013) with a good signal-to-noise ratio for ^2H solid-state- NMR spectra. Moreover, this study supports the idea of the importance of using bacteria instead of model membranes because interestingly the effect of fullereneol nanoparticles on *E. coli* bacteria differs to what has been shown for DPPC/DPPG bilayers (Brisebois *et al.*, 2012).

In the present work we have expanded our analysis to investigate the effect of caerin 1.1 and aurein 1.2 on intact *E. coli* (Gram-) and *B. subtilis* (Gram+) bacteria. Given that this is the first reported ^2H NMR study of *B. subtilis*, we first characterized the phospholipid profile of the deuterated *B. subtilis* membranes compared to non-labelled and their temperature behavior. Then, the ^2H NMR spectral moments were exploited to show the effect of the AMPs, caerin 1.1 and aurein 1.2, on the molecular order and dynamics of the lipid acyl chains.

4.4 Materials et methods

4.4.1 Materials

Caerin 1.1 and aurein 1.2 were synthesized by GenScript Corporation (Piscataway Township, NJ, USA) with N95% purity. Dodecyl phosphocholine (DPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Oleic acid (OA), deuterated palmitic acid (d₃₁-PA), deuteriumdepleted water and 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Canada). *E. coli* BL21 and *B. subtilis* PY79 strains were kindly provided by Prof. S. Jenna (UQAM) and É. Déziel (Institut Armand-Frappier), respectively.

4.4.2 Minimum inhibitory concentration

The activity of caerin 1.1 and aurein 1.2 against *E. coli* and *B. subtilis* was evaluated by measuring of the minimum inhibitory concentrations (MIC) using the serial dilution technique (Yoshida *et al.*, 2001) in a cell suspension containing 10⁴ cells/mL, with the peptide solution at different dilutions. Bacteria were incubated at 37 °C and the absorbance at 600 nm monitored every 30 min over a 24 h period.

4.4.3 Sample preparation

BL21 strain *E. coli* was grown as described (Tardy-Laporte *et al.*, 2013) with 0.19 mM d₃₁-PA (incorporated into DPC micelles) added in the growth medium with 0.19 mM OA to preserve the fluidity of the membrane (Warnet *et al.*, 2016). *B. subtilis* (PY79) was also grown with 0.19 mM d₃₁-PA incorporated in the growth medium without oleic acid, but the mid-log growth phase is at an A₆₀₀ of 0.5 compared to 0.4 for *E. coli* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). For bacteria exposed to peptide, the pellet was resuspended in 10 mL of Luria broth for 10 min until a homogeneous solution was obtained. Then, the appropriate amount of peptide was added and incubated for 5min. The samples were centrifuged (1500 g for 10 min at room temperature), and the pellets were then used immediately for ²H NMR studies.

4.4.4 Lipid analysis and viability of *Bacillus subtilis*

B. subtilis samples were analysed by gas phase chromatography combined with mass spectrometry to determine the fatty acid composition of their membranes. Briefly, lipid extraction was performed in duplicate on approximately 10 mg of lyophilised labelled *B. subtilis* samples using dichloromethane/methanol (2:1 v/v) and 0.88% KCl solution in a Potter glass homogenizer as described in (Pernet et Tremblay, 2003). Polar lipids were then recovered via separation on a silica gel column, with MeOH as eluent. After evaporation at 40 °C, transesterification was carried out in 2 mL of H₂SO₄ (2% in methanol) and 0.8 mL of toluene for 10 min at 100 °C, then analysed by gas chromatography as described in (Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

B. subtilis samples were also analysed by MTT reduction assays (Wang, H. *et al.*, 2010) to determine the cellular viability. The cell suspension was diluted in fresh LB medium to an A₆₀₀ of 0.1. A reaction mixture of 20 µL of 5 mg/mL MTT solution and 200 µL of cell suspension was incubated at 37 °C for 20 min. After incubation, the formazan crystals were pelleted and dissolved with 1 mL of dimethylsulfoxide at room temperature. After a 15 min stabilisation at room temperature, the optical density was measured at 550 nm.

4.4.5 NMR experiments and moments analysis

In the case of multi-experiments at different temperatures, ²H NMR analyses were recorded on a solid-state Bruker Avance III-HD wide bore 400 MHz spectrometer (Milton, Canada) operating at a frequency of 61 MHz for ²H nuclei. Other experiments were recorded at 37 °C on a 14.1 T hybrid solution/solid-state Bruker Avance III HD (Milton, Canada) operating at a frequency of 92.1 MHz. Static spectra were obtained using the solid-echo pulse sequence (Davis *et al.*, 1976) with a pulse length of 5 µs, a pulse separation of 60 µs, and a 500 ms recycle delay. Data were collected using 100 k points with a dwell time of 0.5 µs, and a line broadening of 50 Hz was applied. Spectra acquired at 10 kHz MAS frequencies were obtained using a modified Hahn-echo pulse

sequence (Bloom *et al.*, 1980; Clayden, 1986), with an initial 45° pulse. A total of 8 k points were collected with a dwell time of 0.5 μ s and a repetition delay of 500 ms.

A specific quadrupolar splitting is difficult to determine in ^2H solidstate- NMR spectra with a distribution of quadrupolar splittings. Thus, to quantify the intensity distribution of the spectra as a function of quadrupolar splitting, spectral moments M_n (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011) were calculated from the symmetric ^2H NMR powder patterns using the following equation

$$M_n = \frac{\int_0^\infty \omega^n f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega} \quad (4.1)$$

where ω is the frequency with respect to the nuclear Larmor angular frequency ω_0 and $f(\omega)$ is the line shape. As shown by Maricq and Waugh (Maricq et Waugh, 1979) and recently reported by Warnet (Warnet *et al.*, 2016), to analyse magic angle spinning (MAS) spectra, spectral moments are more simply extracted according to:

$$M_n = \omega_r^n \frac{\sum_{N=0}^\infty N^n A_N}{\sum_{N=0}^\infty A_N} \quad (4.2)$$

where ω_r is the spinning rate ($\omega_r = 2\pi\nu_r$, where ν_r is expressed in Hz) and A_N is the area of the Nth sideband.

Spectral moments M_1 and M_2 from static spectra were calculated using the MatNMR software (van Beek, 2007) and from MAS spectra using MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). These spectral moments reveal the changes in gel and fluid phases and were used to calculate the relative mean square width of the distribution of quadrupolar splittings (Δ_2), which informs on membrane heterogeneity:

$$\Delta_2 = \frac{M_2}{1.35M_1^2} - 1 \quad (4.3)$$

The values from the static or MAS spectral analysis did not differ significantly and, therefore, MAS spectra, which require a much shorter acquisition time are discussed here and the static spectra are shown in Supplementary information.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Characterization of ^2H -labelled *B. subtilis*

Prior to studying *B. subtilis* bacteria by NMR, the efficiency of ^2H labelling and its effect on the lipid profile were assessed. The labelling was carried out by growing the bacteria in the presence of d_{31} -PA. Contrary to *E. coli*, OA was not used since oleic acid chains are not naturally found in the lipid composition of *B. subtilis*. As shown in Table 4.3, deuteration levels were close to 60% for saturated (C16:0) lipids. Note that the labelled palmitic acyl chains are incorporated exclusively in the phospholipids and without modification, i.e., 60% of PG, PE and CL palmitic chains are d_{31} -labelled. As detailed by Tardy-Laporte et al. (Tardy-Laporte *et al.*, 2013), the LPS are not deuterated in *E. coli*. According to Koch et al. (Koch *et al.*, 1984), LTAs typically account for 6–10mol% in Gram (+) bacteria, and the biosynthesis of LTAs utilizes a fraction of the bacteria's PG pool (Percy et Gründling, 2014). Since PG lipids can have various chain lengths, and assuming that 60% of PG lipids with C16:0 acyl chains are deuterated, the total amount of ^2H labelled LTAs is likely to be negligible and its signal too weak to contribute to the ^2H NMR spectra. Interestingly, the functionally important ratio of total saturated-to-unsaturated lipids was only slightly altered from 58:42 in wild type to 64:36 in labelled *B. subtilis* (Table 4.3 and Figure 4.1). This minor change, therefore, is not expected to significantly alter the membrane fluidity.

We further assessed whether the labelling protocol, the washing procedure or the NMR experiments affected cell viability. As shown in Figure 4.1 and Table 4.4, the changes due to labelling or washing are within the uncertainty of the viability measurement. After 15 h in the NMR spectrometer, during which the growth medium is unchanged and scant due to rotor packing, 40% of the bacteria survived. This

percentage is the same as observed with *E. coli* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013) and compatible with *in vivo* studies in particular using the short MAS experiments which further preserve cell viability (Warnet *et al.*, 2016).

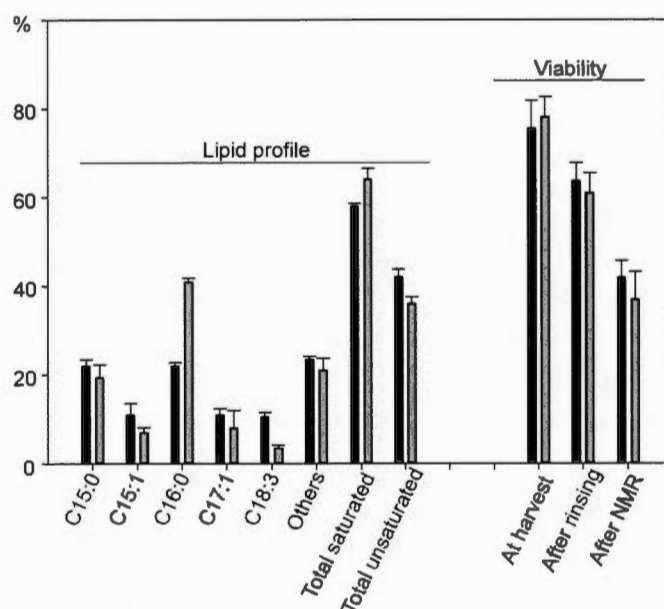


Figure 4.1 Effect of deuterium labelling protocol on lipid profile (n =2) and cell viability (n = 3) of *B. subtilis*. Black: unlabelled, and gray: ^2H -labelled bacteria

The physical state of the membrane lipids was assessed by following the evolution of spectral moments as a function of temperature. It was previously demonstrated that the ^2H solid-state NMR spectra of *E. coli* have “characteristic features” representative of different phases (Davis *et al.*, 1979; Tardy-Laporte *et al.*, 2013). The ^2H spectra obtained at 15 °C, 30 °C and 52 °C are shown in Figure 4.5. At 15 °C, there is a broad spectrum showing the presence of gel/crystalline phase. At 30 °C, the appearance of shoulders around ± 20 kHz and with a quadrupolar splitting of 30 kHz at the edges of the plateau indicates the presence of the fluid/liquid phase. This plateau slightly decreases at 52 °C with an increase in proportion of the isotropic peak.

The ^2H MAS NMR (Figure 4.2) spectrum at 12 °C indicates a higher intensity of spinning sideband manifold, which is characteristic of the gel phase. When the temperature was raised to 52 °C, an increase in the intensity of isotropic peak together with a decrease in the spinning sideband manifold was observed. This is due to motional averaging (Davis *et al.*, 1979) and supported by the spectral moment analysis (Tables 4.1 and 4.5). The decrease in both M_1 and M_2 observed with the rise of temperature is indicative of reduced acyl chain order and spectral distribution, respectively. The value of Δ_2 , which informs on the membrane heterogeneity, was low at 12 °C and 37 °C but increased at 32 °C due to the coexistence of gel and liquid-crystalline phases at this temperature. In summary, the results show that the effectiveness of the deuteration protocol was sufficient to enable NMR studies and has only a minor effect on the lipid profile and resulting physical state of *B. subtilis* membranes.

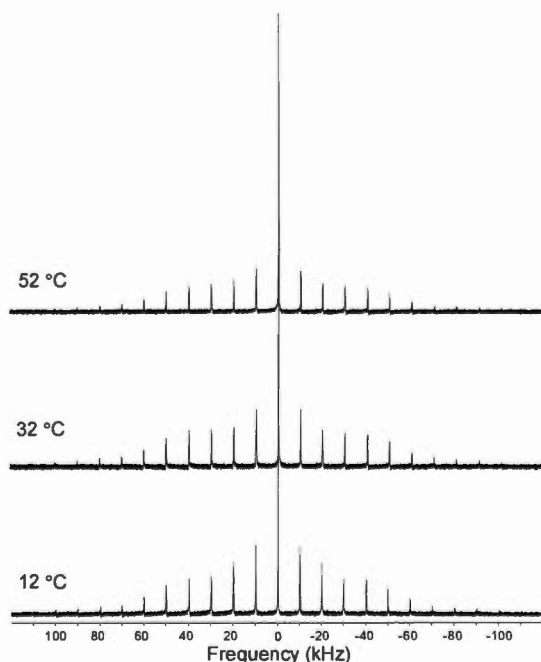


Figure 4.2 MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 12°C, 32°C and 52°C with 8 k scans. The equilibration time in these experiments was 15 min

Table 4.1 Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labeled *B. subtilis* at different temperatures^a

T (°C)	M_1 (10^4 s^{-1})	M_2 (10^9 s^{-2})	Δ_2
12	13.7	27.3	0.07
32	11.3	24.5	0.42
37	9.2	14.7	0.12
52	8.2	10.1	0.48

^a Maximum deviations are 10 % for M_1 and 14% for M_2 .

4.5.2 Effect of caerin 1.1 and aurein 1.2 on *E. coli* and *B. subtilis*

First, we determined the MIC of caerin 1.1 and aurein 1.2 for *E. coli* and *B. subtilis*. The obtained values show that both peptides had an effect on both types of bacteria with a MIC of 30 $\mu\text{g/mL}$ for *B. subtilis* and 100 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* (Table 4.6). These values are consistent with previous studies (Chia *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2009). The more potent inhibitory effect in the case of *B. subtilis* can be explained by the less complex membrane structure of *B. subtilis*, due to the absence of the outer membrane and the periplasm which facilitate their interaction with phospholipid membranes, and/or the different membrane lipid composition (Epand, R. F. *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2001).

Further, in regard to the membrane effects of peptides, Figure 4.3 shows the ^2H NMR MAS spectra acquired at 37 °C of labelled *E. coli* and *B. subtilis* when exposed to MIC of caerin 1.1 or aurein 1.2. The ^2H spectra of *E. coli* demonstrate a slight increase in the isotropic peak intensity with a decrease in that of the spinning sidebands in the presence of either peptide. In parallel, ^2H static NMR spectra of *E. coli* (Figure 4.6) confirm the disordering effect with a slight increase in the isotropic peak intensity and a decrease in the width of the shoulders due to the peptides.

The corresponding spectral moments analysis from ^2H solid-state and MAS NMR spectra, shown in Tables 4.7 and 4.2, respectively, indicates an increase in lipid chain dynamics with a decrease of M_1 from 3.2 to 2.8 and 2.5 in the presence of caerin 1.1 and aurein 1.2, respectively (Table 4.2). At 37 °C, the membrane phospholipids of *E. coli* are in the fluid phase with a quadrupolar splitting estimated to 40 kHz, and the disorder caused by the presence of the AMPs has increased the proportion of fluid phase. The values of Δ_2 (Table 4.2) show the coexistence of fluid and gel phases in *E. coli* membranes with an increase from 0.12 to 0.59 and 0.69 in the presence of caerin and aurein, respectively. This increase in the distribution of the quadrupolar splittings in contrast to the decrease in spectral moments is explained by the diminution or the rapid disappearance of CD_3 splittings compared to CD_2 splittings (Davis *et al.*, 1979).

Table 4.2 additionally highlights the effect of aurein 1.2 compared to that of caerin 1.1 on *E. coli*, with a higher increase in Δ_2 in the presence of aurein. This result is consistent with the hypotheses by Fernandez *et al.* (Fernandez *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2013) on the action mechanism of AMPs with model membranes, which suggest that aurein is able to cause an abrupt destabilisation of the membrane and its permeability. Caerin 1.1 rather than aurein 1.2 tends to insert into the phospholipid bilayers by the formation of transmembrane pores with a less destructive effect of the membrane.

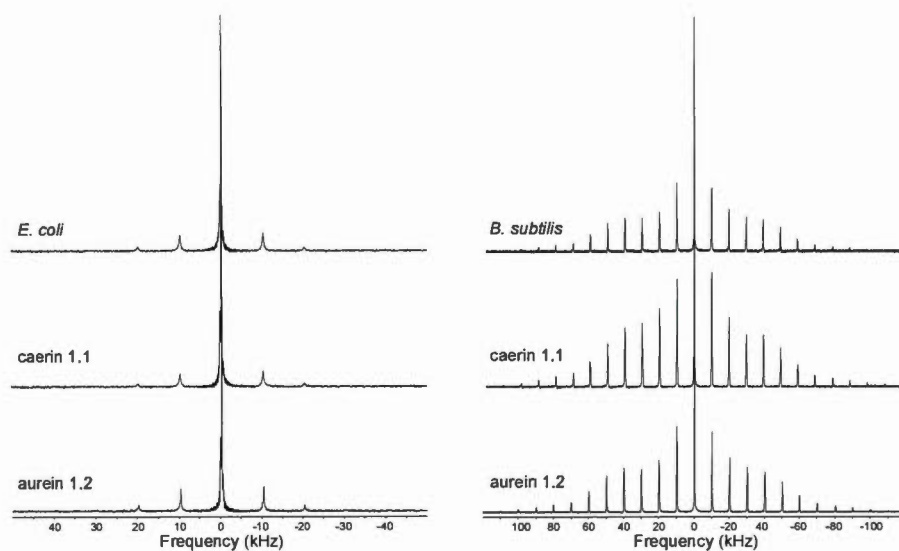


Figure 4.3 MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact *E. coli* and *B. subtilis* acquired at 37°C with 8 k scans and with addition of MIC of caerin 1.1 or aurein 1.2.

Table 4.2 Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labelled *E. coli* and *B. subtilis*, without and with the presence of AMPs at different concentrations.

Sample	AMP ($\mu\text{g/mL}$)	M_1 (10^4 s^{-1})	M_2 (10^9 s^{-2})	Δ_2
<i>B. subtilis</i> ^a	—	9.2 (0.2) ^b	15 (2)	0.16
+ caerin 1.1	MIC	9.4 (0.6)	15 (1)	0.23
	45	6.6 (0.3)	8 (1)	0.37
	60	4.0	3.3	0.51
+ aurein 1.2	MIC	12 (2)	23 (3)	0.07
	45	13 (3)	27 (4)	0.34
	60	3.8 (0.6)	3 (2)	0.78
<i>E. coli</i> ^a	—	3.2 (0.3)	1.6 (0.7)	0.12
+ caerin 1.1	MIC	2.8 (0.3)	1.6 (0.6)	0.59
+ aurein 1.2	MIC	2.5 (0.2)	1.4 (0.2)	0.69

^a MIC is $\sim 30 \mu\text{g/mL}$ for *B. subtilis* and $\sim 100 \mu\text{g/mL}$ for *E. coli*.

^b Standard deviation based on four measurements.

In the case of labelled *B. subtilis*, Figure 4.3 shows that the spectrum of these Gram (+) bacteria have a quadrupolar splitting of 120 kHz, higher than that observed for *E. coli* membranes (~ 40 kHz). This difference indicates that *B. subtilis* membranes are more rigid than those of *E. coli* at 37 °C and is due to the proportion of saturated fatty acids, which is about 64% in *B. subtilis* compared to 51% in *E. coli* (Warnet *et al.*, 2016). This difference can also be explained by the presence of LTAs in the peptidoglycan of *B. subtilis*, which has a stabilizing effect on lipid membranes. A study

by Gutberlet et al. (Gutberlet *et al.*, 1997) demonstrated that the addition of LTA to a dipalmitoylPG matrix causes an ordering effect on the lipid membrane close to the head group region.

Concerning the spectra of labelled *B. subtilis* exposed to AMPs at MIC, the spectral analysis in Table 2 shows an increase in M_1 and M_2 . M_1 increased in the presence of caerin 1.1 from 9.2 to 9.4, and to 12 in the case of aurein 1.2. This indicates that at the MIC, the interaction of both peptides with *B. subtilis* membrane reduced the dynamics of the lipid chains. This effect was not observed in *E. coli* when exposed to 75 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ of caerin 1.1 (data not shown), which is below the MIC of 100 $\mu\text{g/mL}$.

To better understand the interaction of *B. subtilis* with aurein 1.2 and caerin 1.1, bacteria were then exposed to AMP concentrations of 45 and 60 $\mu\text{g/mL}$, i.e., above the MIC. The spectra are shown in Figure 4.4 and the corresponding spectral moments in Table 2. Starting with caerin 1.1, the spectra show a decrease in the intensity of the MAS sidebands with intensification of the isotropic peak. At 45 $\mu\text{g/mL}$, caerin 1.1 exerts its mode of action by disordering the lipid chains. This observation is supported by the decrease of M_1 and M_2 values (Table 2), but a smaller Δ_2 would be expected. As mentioned earlier, this can be explained by the decrease or the rapid disappearance of CD_3 splittings compared to CD_2 splittings (Davis *et al.*, 1979), but in this case it may also be due to the association of caerin 1.1 and phospholipids causing heterogeneity in the membrane. Disorder was enhanced at 60 $\mu\text{g/mL}$ with the reduction in MAS sidebands from 16 to 4 (Figure 4.4), and also with the appearance of 'Feature X' circa ± 10 kHz (Figure 4.7) which reports on the degradation of the bacterial cells (Davis *et al.*, 1979). 'Feature X' is usually present in the spectra but is only visible in the case of intensive degradation which may be due to the caerin 1.1. Our focus was on short term effects and bacteria, therefore, were not incubated for more than 5 min. Greater effects might be expected using a longer incubation time.

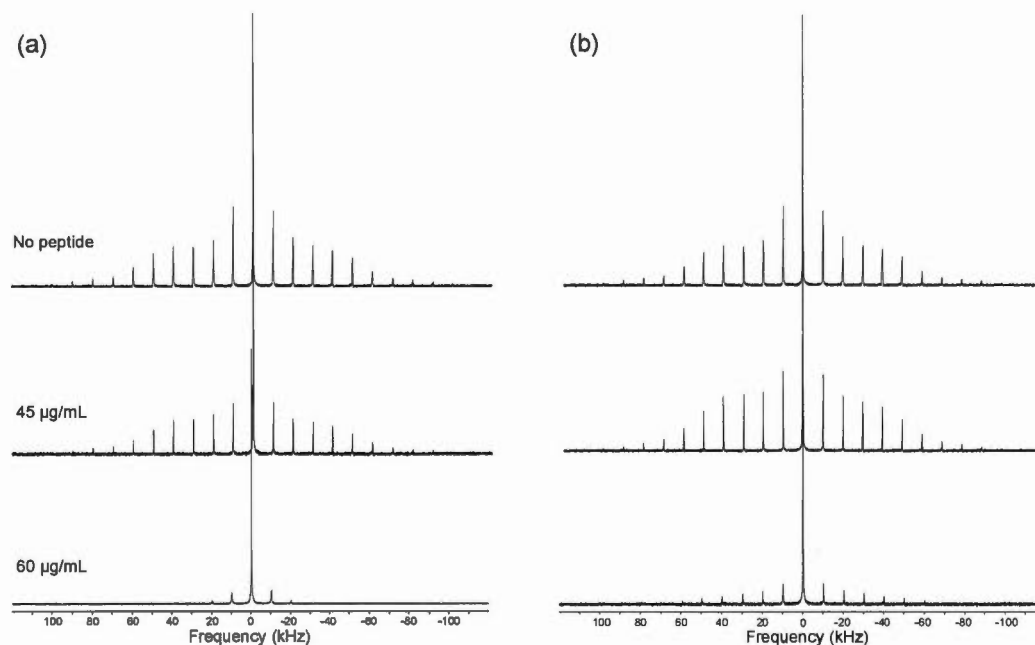


Figure 4.4 ^2H MAS NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 37°C and with 8 k scans and with the addition of different concentrations of (a) caerin 1.1, and (b) aurein 1.2

In the case of aurein 1.2, the disorder increase of the lipid chains was observed at $60\text{ }\mu\text{g/mL}$, which means that a higher concentration of aurein is required to exert its mode of action on the *B. subtilis* (Gram+) phospholipid membrane. This may also be related to the smaller size of aurein with 13 residues compared to caerin 1.1 with 25 residues. A specific interaction of aurein 1.2 with TAs and LTAs or other bacterial components may reduce its interaction with the membrane and the disordering effect.

The difference in peptide concentrations, which caused disorder in membrane lipids of Gram (–) and Gram (+) bacteria, highlight the importance of *in vivo* studies. Gram (+) *B. subtilis* is characterized by a thick peptidoglycan layer which accounts for about 90% dry weight of the membrane (Malanovic et Lohner, 2016). This rigidity is provided by TAs that are covalently bound to peptidoglycan and by the LTAs anchored to the membrane via diacylglycerol. A negatively charged LTA polymer has been

demonstrated to interact with cationic peptides (Bucki et Janmey, 2006) and the interaction of PBP10, LL-37 and melittin with LTA inhibits their antimicrobial activity. The inhibition has been suggested to be due to the decrease of peptide concentration on the membrane as a result of the increase in peptide adsorption to the bacterial surface (Malanovic et Lohner, 2016). Further, that the disordering effect was not observed at the MIC highlights the idea that the inhibition is not via membrane destabilisation but via the interaction of peptides with other bacterial cell membrane components. Further work, however, is necessary to elucidate the relative importance and mechanisms of interaction of aurein 1.2 and caerin 1.1 with TAs and LTAs.

4.6 Conclusion

We have investigated the interaction of caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact Gram (+) and Gram (–) bacteria by ^2H solid-state NMR following deuteration of their membrane lipid acyl chains. To do so, we have proposed a ^2H -labelling protocol for the phospholipids of non-mutated *B. subtilis*. Magic-angle spinning combined to moment analysis allowed collecting high-quality spectra with a reduced number of scans. Aurein 1.2, which was reported to act via a carpet mechanism, was shown to be more membrane disruptive on *E. coli* than caerin 1.1 which is known to form transmembrane pores. The disordering effect observed on the membrane lipids at concentrations higher than the MIC on *B. subtilis* seem to indicate electrostatic interactions of caerin 1.1 and aurein 1.2 with other components present in the peptidoglycan, such as the negatively-charged teichoic and lipoteichoic acids, and suggests that the inhibition effect is not only mediated by membrane destabilisation or disruption. Altogether, our results reveal the importance of *in vivo* NMR study, where the action mechanism of AMPs was shown to depend on the membrane environment and on the actual peptide concentration at the lipid membrane surface. Our results have led us to develop strategies for two dimensional ^{13}C - ^{15}N solid-state NMR to determine the interaction of AMPs with TA and LTA.

4.7 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant 326750-2013), and the Australian Research Council (grant DP140102127). For the award of scholarships, M.L. is grateful to the Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP), to Pharmaqam and to the Faculté des Sciences of the Université du Québec à Montréal, and A.E.G. to the Canadian Institutes of Health Research Chemical Biology training program and the NSERC of Canada. The authors would like to thank É. Déziel and F. Jean-Pierre (INRS-IAF), and M. Babin (UQAR) for technical advice and support, as well as D.E. Warschawski for stimulating discussions. I.M. is a member of the GRASP and the Centre de recherche sur les Matériaux Fonctionnels.

4.8 Supplementary material

Table 4.3 Fatty acid composition of labelled and unlabelled *B. subtilis* phospholipids by GC-MS with standard deviation.

	% Fatty acid (w/w)	
	Unlabelled	Labelled
C15:0	22 (1)	20 (3)
C15:1	11 (2)	7 (1)
C16:0	22 (1)	41 (1) (60% deuterated)
C17:1	11 (1)	8 (4)
C18:3	10.5 (1)	3.5 (1)
Others	23.5 (1)	21 (3)
Total saturated	58 (1)	64 (3)
Total unsaturated	42 (2)	36 (2)

Table 4.4 Percentage of live *B. subtilis* after rinsing and NMR experiments, by MTT reduction activity. The mean values with standard deviation are obtained in triplicate.

Analysis	% Viability	
	Unlabelled	Labelled
At harvest	76 (6)	78 (5)
After rinsing	64 (4)	61 (5)
After NMR	42 (4)	37 (6)

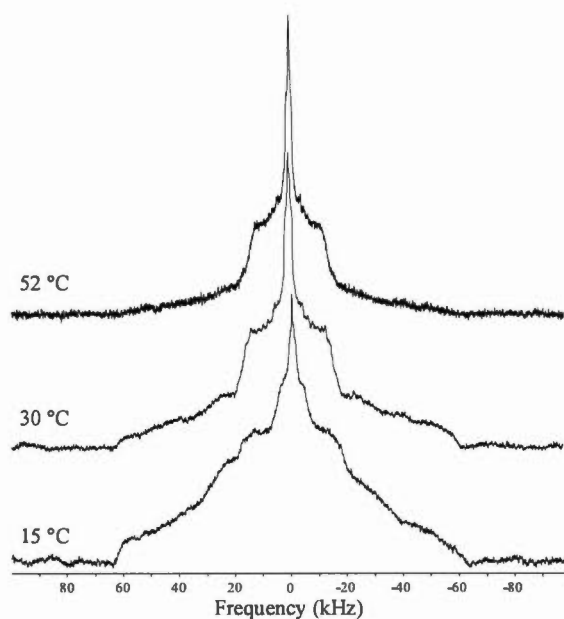


Figure 4.5 ^2H solid-state NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 15°C, 30°C and 52°C with 100 k scans. The equilibration time between each temperature was 15 min.

Table 4.5 Spectral moment analysis with standard deviation of static ^2H solid-state NMR spectra of labeled *B. subtilis*, at different temperatures.

T (°C)	M_1 (10^4 s^{-1})	M_2 (10^9 s^{-2})	Δ_2
12	13.6 (0.3)	30 (2)	0.19
32	10.4 (0.6)	21.9 (0.3)	0.52
37	9.7 (0.1)	16 (3)	0.16
52	8 (1)	10.9 (0.3)	0.48

Table 4.6 Antibacterial activity of caerin 1.1 and aurein 1.2.

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Caerin 1.1	Aurein 1.2
<i>E. coli</i>	100	100
<i>B. subtilis</i>	30	30

Table 4.7 Spectral moment analysis with standard deviation of static ^2H solid-state NMR spectra of labeled *E. coli* and *B. subtilis*, without and with the presence of AMPs at different concentrations.

Sample	AMPs ($\mu\text{g/mL}$)	M_1 (10^4 s^{-1})	M_2 (10^9 s^{-2})	Δ_2
<i>B. subtilis</i> ^a	—	9.2 (0.2)	13 (1)	0.16
+ caerin 1.1	MIC	9.9 (0.3)	16.4 (0.2)	0.23
	45	6.6 (0.6)	8 (1)	0.38
	60	4.1	3.2	0.39
+ aurein 1.2	MIC	12.3 (0.9)	24 (3)	0.18
	45	12.6 (0.6)	27 (2)	0.28
	60	4.2	3.6	0.52
<i>E. coli</i> ^a	—	3.3 (0.1)	2.0 (0.1)	0.40
+ caerin 1.1	MIC	2.8 (0.1)	1.6 (0.2)	0.50
+ aurein 1.2	MIC	2.5 (0.2)	1.6 (0.1)	0.70

^a MIC is $\sim 30 \mu\text{g/mL}$ for *B. subtilis* and $\sim 100 \mu\text{g/mL}$ for *E. coli*.

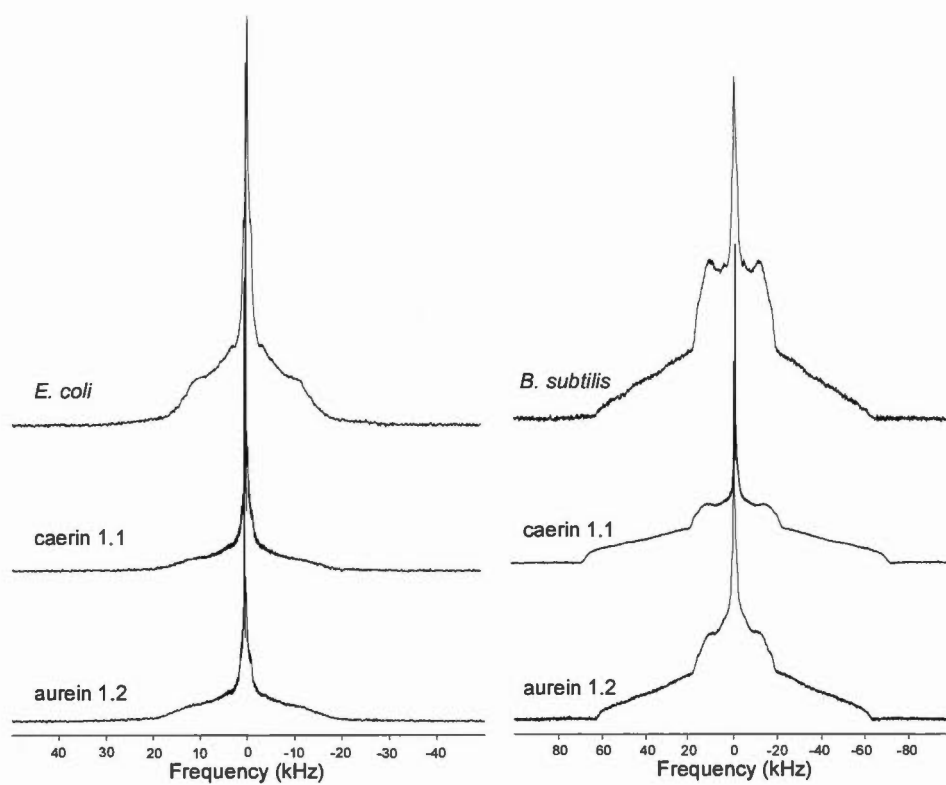


Figure 4.6 ^2H solid-state NMR spectra of intact *E. coli* and *B. subtilis* acquired at 37°C with 100 k scans and with the addition of the MIC of caerin 1.1 and aurein 1.2.

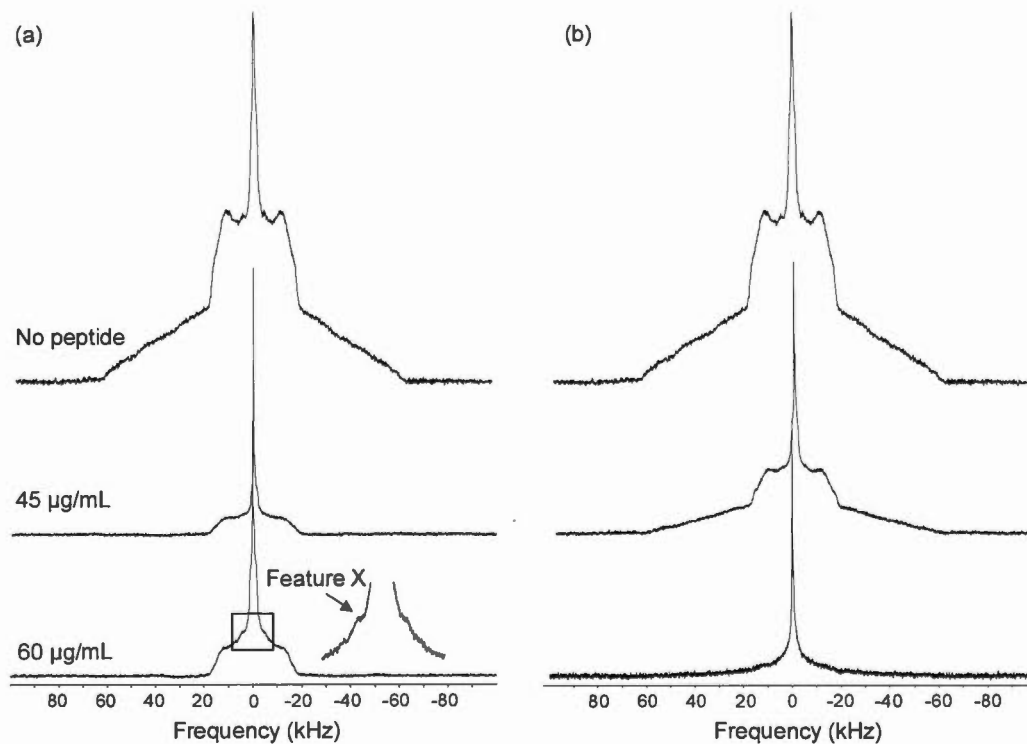


Figure 4.7 ^2H solid-state NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 37°C with 100 k scans and with the addition of different concentration of (a) caerin 1.1, and (b) aurein 1.2.

CHAPITRE V

DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES DE MARQUAGE POUR LA CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES ENTIÈRES

5.1 Objectifs

Nous avons observé, dans le chapitre précédent, que l'effet de la caérine 1.1 et de l'auréine 1.2 est différent sur les bactéries *E. coli* (Gram-) et *B. subtilis* (Gram+). Ceci nous a amené à l'idée que les acides téichoïques et lipotéichoïques présents dans le peptidoglycane de *B. subtilis* jouent potentiellement un rôle dans l'effet observé des AMPs sur les membranes bactériennes. Ainsi, dans le but d'étudier *in vivo* l'interaction des AMPs avec les constituants du PGN par des expériences en RMN ^{13}C - ^{15}N , notre premier objectif était de caractériser les bactéries entières par RMN- ^{13}C .

Les bactéries étant des organismes complexes, tel que mentionné dans la section 1.7.2, les chercheurs ont eu recours à l'extraction de leurs différents constituants tels que le PGN et les LPS dans le but de simplifier les analyses en RMN (Kern *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2008; Renault *et al.*, 2012). Dans le contexte de l'étude des bactéries intactes, afin de simplifier les spectres, et dans la même optique de sélectionner les composants bactériens (sélection des membranes aux chapitres III et IV), notre alternative est de développer des stratégies d'effaçage de signaux des constituants autres que le PGN. Ce chapitre traite donc d'une stratégie d'effaçage de signaux des lipides par l'incorporation des lipides "froids" (^{12}C) dans des bactéries marquées au ^{13}C . Pour ce faire, différentes conditions de culture ont été testées pour les deux bactéries, et ceci soit par l'ajout de lipides totaux extraits des bactéries (LT), de lipides polaires extraits

des bactéries (LP), de lipides totaux extraits et hydrolysés en AGs (LTH), de lipides polaires extraits et hydrolysés en AGs (LPH), dans le milieu de culture ou par l'ajout des AGs abondants dans les bactéries soient le PA et l'OA. Cinq conditions de culture ont été testées pour *B. subtilis* (LT/ LTH/ LP/ LPH/ PA) et trois pour *E. coli* (LT/ LTH/ PA+OA).

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Matériel

La dodécylphosphocoline (DPC) et les lipides totaux extraits d'*E. coli* ont été achetés d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). L'acide palmitique deutéré (PA-d₃₁), l'acide oléique (OA) ainsi que le glycérol-¹³C₃ proviennent de *Sigma Aldrich* (Saint Louis, MI, USA). Le Tween 20 (Monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitane) provient de *Bioshop* (Burlington, ON, Canada).

5.2.2 Préparation des bactéries marquées au ¹³C

Les bactéries *E. coli* et *B. subtilis* sont cultivées dans un milieu minimal M9 (12,8g Na₂HPO₄·7 H₂O, 3g KH₂PO₄, 0,5g NaCl, 1g NH₄Cl, 0,25g MgSO₄, 0,015g CaCl₂), supplémenté de 0.25 g/L⁻¹ de peptone dans le cas de *B. subtilis*, à 37 °C en présence de 3g/L glycérol-¹³C₃. Le milieu M9 a été choisi de manière à assurer un meilleur taux d'incorporation du glycérol-¹³C₃ vu que ce dernier est la seule source de carbone des bactéries. Des courbes de croissance ont été réalisées à différentes concentrations de glycérol-¹³C₃ afin de choisir la concentration de 3 g/L induisant un meilleur taux de croissance bactérienne pour *E. coli* et *B. subtilis* (Figure 5.1).

Les cellules prélevées à la moitié de la phase exponentielle DO_{600nm} = 0,5 sont lavées deux fois avec une solution saline (NaCl 100 mM) et deux fois avec le tampon phosphate PBS afin d'éliminer le glycérol-¹³C₃ en surplus dans le milieu de culture et éviter les interférences dans les spectres de RMN-¹³C. Les culots sont ensuite analysés au moyen d'une sonde de 4 mm en RMN-ÉS-¹³C.

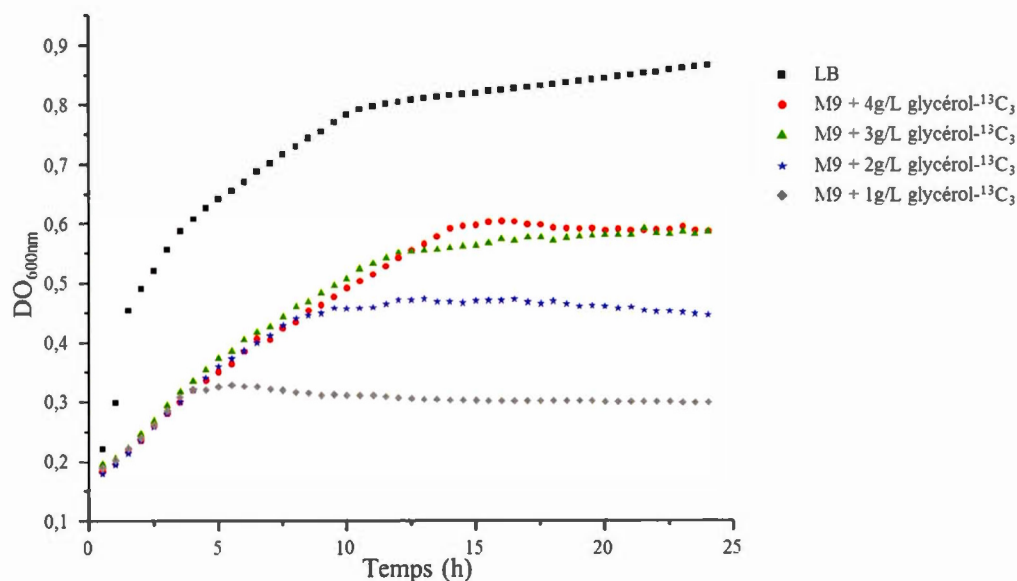


Figure 5.1 Courbe de croissance de *B. subtilis* en fonction de la concentration du glycérol- $^{13}\text{C}_3$.

5.2.3 Extraction des lipides de *B. subtilis*

Dans le cas de *B. subtilis*, non disponibles commercialement, les lipides totaux et polaires de *B. subtilis* ont été extraits tel que décrit à la section 3.2.3.

5.2.4 Hydrolyse des lipides

Les lipides totaux d'*E. coli* commerciales, ainsi que des proportions des lipides totaux, et de lipides polaires extraits de *B. subtilis* sont traités par un mélange de KOH/méthanol (~ 5 mL pour 30 mg de lipides) pendant 1h à 80 °C (mélange au vortex chaque 5 min) et lavées deux fois à l'éther afin d'enlever les lipides non saponifiables. Les surnagants récupérés sont ensuite traités avec HCl (6M) et lavés deux fois avec de l'hexane incluant une étape d'agitation au vortex et de dégazage. Enfin, les lipides

récupérés dans l'hexane sont soumis à un flux d'azote à température ambiante afin d'évaporer le solvant.

5.2.5 Incorporation des lipides et des AGs (^{12}C) dans les bactéries marquées au ^{13}C

5.2.5.1 Suivi de la croissance bactérienne

De manière à vérifier la capacité d'*E. coli* et *B. subtilis* à croître dans un milieu M9 en présence du glycérol- $^{13}\text{C}_3$ et des AGs, des tests de croissance bactérienne ont été établis sur un lecteur de microplaque (Infinite M200 de TECAN) à 37 °C. Pour ce faire, les différents milieux ont été déposés sur une plaque de 24 puits. La lecture de DO à 600 nm se fait chaque 30 min précédée de 5 min d'agitation (225 rpm), et ceci pendant 24 h.

Pour *B. subtilis*, l'optimisation de la croissance cellulaire a été réalisée en testant l'incorporation d'acide palmitique incorporé dans des micelles de DPC (tel que décrit dans la section 3.2.2) à des concentrations de 0.5 et 1 mM, et dans des micelles de Tween 20 à des concentrations de 0.15 et 0.2 mM. Pour *E. coli*, de la même façon, le PA est incorporé dans des micelles de DPC à 0.5 mM et dans du Tween 20 à 0.15 mM. Chaque condition a été analysée en triplicata.

5.2.5.2 Préparation des échantillons pour la RMN

Les lipides totaux (LT) et les lipides polaires (LP) sont dispersés par sonication (130W) sous glace pendant 15 à 30 min afin de former de petites vésicules unilamellaires (SUV) et ajoutés directement dans le milieu de culture. Dans le cas des lipides hydrolysés (LTH et LPH) ainsi que pour les acides palmitique et oléique, ils sont incorporés dans des micelles de Tween 20 (0.15 mM), et ceci de la même manière qu'avec la DPC décrite dans la section 3.2.2.

Cinq conditions de culture ont été testées pour *B. subtilis* (LT/ LTH/ LP/ LPH/ PA) et trois pour *E. coli* (LT/ LTH/ PA+OA). Ces milieux sont cultivés dans un milieu M9 en présence du glycérol- $^{13}\text{C}_3$ à 37 °C sous agitation (225 rpm) jusqu'à atteindre la moitié de la phase exponentielle après 4h.

5.2.5.3 Expériences de RMN

Toutes les expériences de RMN ont été effectuées à 12 °C avec un spectromètre Bruker Avance III-HD de 400 MHz (Milton, Ontario, Canada) pour l'état solide. Les spectres sont obtenus à 10 kHz au moyen de la séquence d'impulsion NOE-DP (présentée à la section 2.3.3). Le NOE est appliqué pendant 2s à une puissance de 0.1 W suite à 1s de délai de recyclage, suivi d'une impulsion de 90° sur le ^{13}C (à 140W pendant 3,5 μs). Un découplage de 97,7W est appliqué sur le ^1H pendant tout le délai d'acquisition du noyau ^{13}C . Un total de 1024 scans ont été obtenus pour chaque échantillon, pour une durée de 1h30, "si non autrement précisé". Les résonances du ^{13}C et du ^1H sont calibrées avec l'adamantane comme référence externe (pic à 38.23 ppm). Le traitement de données des spectres se fait avec le logiciel MestReNova (Masterlab Research, Santiago de Compostelle, Espagne) Une correction de ligne de base et de phase, ainsi qu'une multiplication exponentielle (*line broadening*) de 10 Hz sont appliqués sur chaque spectre.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Attribution spectrale des constituants d'*E. coli* et de *B. subtilis*

Les précédents travaux de différents groupes de recherche (Fan, 1996; Gillet *et al.* ; Husted *et al.*, 1993; Kern *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2008; Renault *et al.*, 2012) nous ont aidés à attribuer les déplacements chimiques des principaux constituants des bactéries. Les structures de ces constituants, à savoir le PGN, les LPS chez *E. coli*, les acides téichoïques et lipotéichoïques chez *B. subtilis*, le PGN ainsi que les lipides des deux bactéries sont rappelées dans les Figures 1.5, 1.6, 1.7 et 5.2, respectivement.

L'ensemble des pics entre 10 et 40 ppm correspondent aux carbones des lipides (Tableau 5.1 et Figure 5.3). Ceux entre 50 et 110 ppm ont été attribués aux carbones des cycles des sucres de plusieurs structures majoritairement ceux des acides téichoïques présents dans le PGN (Tableau 5.1). Le C1 de l' α -glucose, substituant de certains glycérols des acides téichoïques a un déplacement chimique de 98.3 ppm, d'où la présence d'un pic chez *B. subtilis* qui n'existe pas chez *E. coli*. De plus, la bactérie d'*E. coli*, étant composée de deux membranes lipidiques, et relativement au massif de pics appartenant au PGN, la Figure 5.2 montre que le signal des lipides d'*E. coli* est beaucoup plus intense comparativement à celui de *B. subtilis*. Une autre différence remarquable sur le spectre de *B. subtilis* par rapport à celui d'*E. coli* est l'absence du pic des liaisons CH=CH à 130 ppm. Cependant, ce pic apparait sur le spectre NOE-DP du PGN purifié de *B. subtilis*, montré dans la Figure 5.4. Une hypothèse serait que le signal se trouve dans le bruit de fond, à cause de la mobilité différente de ces carbones dans la bactérie de *B. subtilis* entière.

D'après ces attributions, il semblerait que le glycérol- $^{13}\text{C}_3$ ait été incorporé correctement dans la majorité des constituants des bactéries. Cependant, on ne discerne pas de pics évidents de protéines, que du fait de leur diversité, les déplacements chimiques seraient très variés et le signal se trouverait dans le bruit de fond ou sous le massif de pics. De plus, l'attribution possible par les spectres 1D est partielle. Il serait alors intéressant de faire des analyses en 2D sur les bactéries afin d'améliorer l'attribution par la détection des corrélations ^{13}C - ^{13}C . Mais avant de procéder aux analyses en 2D, tel que mentionné plus haut, afin de simplifier les spectres, nous avons choisi d'analyser les bactéries cultivées dans un milieu riche au ^{13}C en présence de lipides froids (^{12}C). Ceci est détaillé dans les sections suivantes.

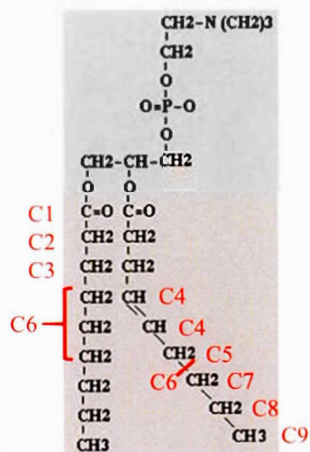


Figure 5.2 Structure des phospholipides et nomenclature des carbones.

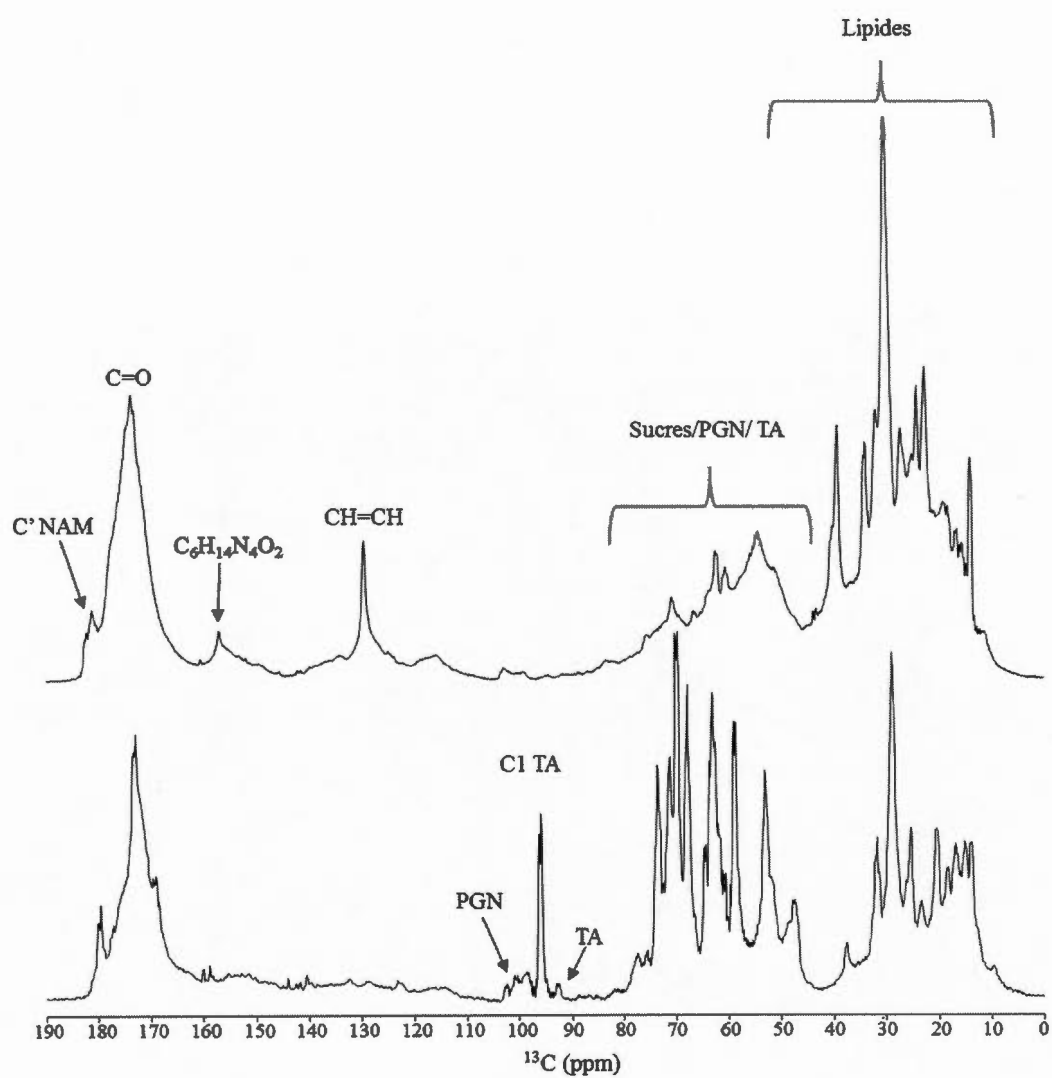


Figure 5.3 Spectres NOE-DP d'*E. coli* (en haut), et de *B. subtilis* (en bas) intactes à 10 kHz.

Tableau 5.1 Constituants des membranes bactériennes et attribution de leurs déplacements chimiques en RMN du ^{13}C .

	Carbone		Ppm
Lipides	C1	COOH	174.5
	C2	C α (C=O)	34.0
	C3	C β (C=O)	25.0
	C4	Carbones oléfiniques (CH=CH)	129.9
	C5	Carbones allyliques (voisin de CH=CH)	27.4
	C6	Chaines méthylènes	29-30
	C7	C β -CH ₃	32.2
	C8	C α -CH ₃	23.0
	C9	CH ₃	14.5*
glycérol-P ^a	C2	C2 glycerol-P ^a	75.6
	C3	C3 glycerol-P ^a	65.2
Acide téichoïque	C1	C1 α -Glc (TA)	98.3
	C2	C2 α -Glc (TA)	72.2
	C3	C3 α -Glc (TA)	73.3
	C4	C4 α -Glc (TA)	70.0
	C6	C6 α -Glc (TA)	61.1
	C2	C2 β -Glc (TA)	72.2
PGN	C2	C2 NAM (PGN)	55.1
	C'	NAM	181.5
	C6	Arginine	157.0
LPS	C6	α -Glc NAC	62.9
	C4	α -Glc NAC	71.5

*Exceptionnellement, la valeur du déplacement chimique du CH₃ terminal est de 15.9 dans le cas de *B. subtilis*. Ceci peut être dû à la mobilité différente de ces carbones d'une bactérie à une autre, ou à un environnement différent.

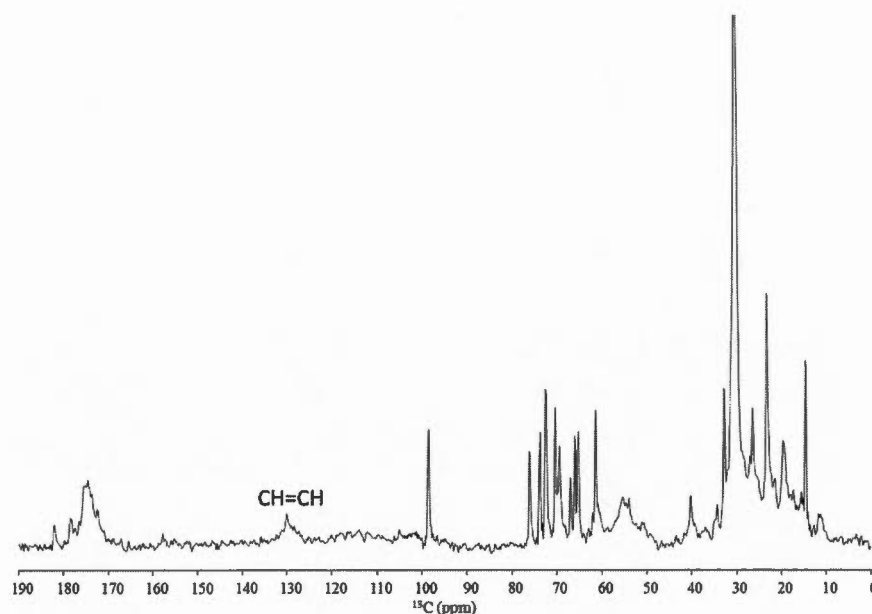


Figure 5.4 Spectres NOE-DP du PGN purifié de *B. subtilis* non marquée. Les spectres ont été enregistrés à 400 MHz et le nombre de scans pour chaque expérience est de 6144 pour une durée de 8h30. Les LTA de *B. subtilis* ont été éliminés par un traitement des cellules au SDS (4%). Ces cellules ont été ensuite éclatées par ultrasonication, traitées avec de l' α amylase (EC 3.2.1.1; Sigma; 100 pg/mL) préparée dans Tris-HCl (pH 7.5) pendant 2h, un mélange de DNase (EC 3.1.21.1; Sigma; 10 pg/mL) et RNase (EC 3.1.27.5; Sigma; 50 pg/mL) avec MgSO_4 (20 mM) pendant 2h, et avec de la trypsine (100 pg/mL) préparée dans 10 mM de CaCl_2 , pendant 16h. Enfin, trois lavages ont été effectués par LiCl (8M), EDTA (100mM) et de l'eau, successivement. Le PGN avec les acides téichoïques intacts récupérés dans le surnagent ont été lyophilisés et réhydratés à 70% avant d'être transférés dans un rotor de 4mm.

5.3.2 Optimisation du protocole d'incorporation des lipides

Les courbes de croissance (Figure 5.5) de *B. subtilis* et d'*E. coli* dans les différentes conditions de culture décrites plus haut montrent que la DPC, et même à une concentration de 0.5 mM inférieure à sa concentration micellaire critique (CMC)

de 1 mM, affecte la croissance d'*E. coli* et de *B. subtilis*. Ceci peut être dû à son pouvoir surfactant qui pourrait détruire la membrane et provoquer la perte de l'intégrité cellulaire dans le cas de la croissance bactérienne dans le milieu minimal M9.

Les autres tests de croissance réalisés avec du Tween 20, un détergent communément utilisé en biochimie pour plusieurs applications, montre que ce dernier est un bon candidat pour maintenir la cinétique de croissance des deux bactéries proche des conditions de glycérol seulement. La concentration de 0.15 mM de Tween 20 a été choisie pour la suite des expériences.

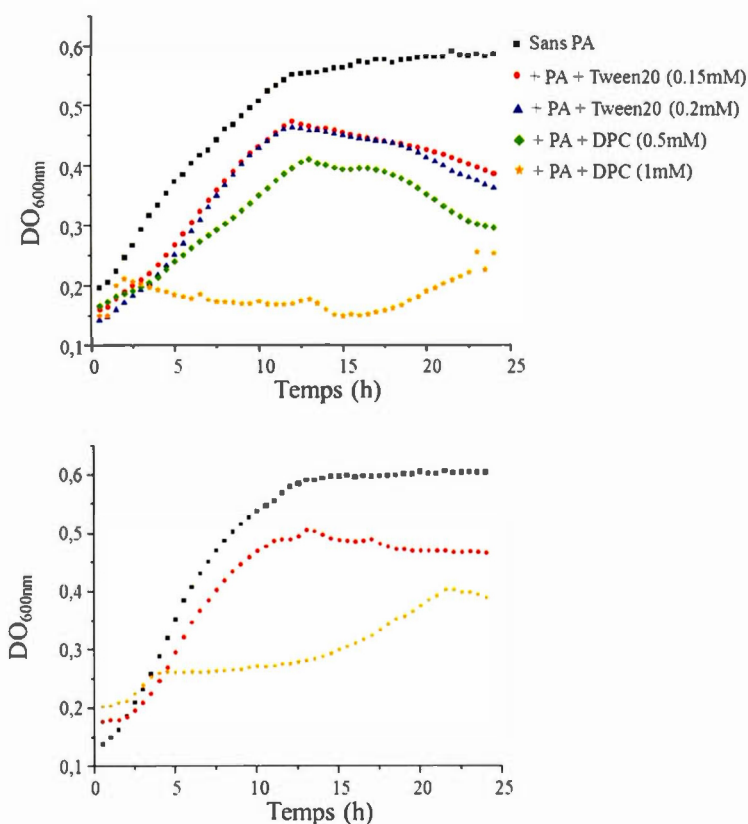


Figure 5.5 Cinétique de croissance de *B. subtilis* (en haut) et d'*E. coli* (en bas) dans un milieu M9 additionné de 3g/L de glycérol-¹³C₃ en présence d'acide palmitique incorporé dans différentes concentrations de DPC et de Tween 20.

5.3.3 Effaçage des lipides

Tous les spectres NOE-DP d'*E. coli* et de *B. subtilis* sous différentes conditions sont présentés dans les Figures 5.6 et 5.7.

Dans le cas des deux bactéries, les spectres sans ajout de lipides, superposés à ceux des bactéries cultivées en présence de lipides, et normalisés avec l'aire totale, montrent que l'intensité de la plupart des pics des lipides diminue. Un exemple de spectre d'*E. coli* superposé à celui d'*E. coli* en présence de LTH, et normalisé avec l'aire totale est montré dans la Figure 5.8.

Afin de mieux apprécier l'effaçage des lipides, de façon qualitative, l'intensité du pic des carbones méthylènes des chaînes acyles des lipides ayant un déplacement chimique de 30 ppm pour les différents échantillons est présentée sous forme d'histogramme à la Figure 5.9. Il est important de préciser que chaque condition de culture n'a été réalisée qu'une fois, et que les données présentées sur la Figure 5.9 sont qualitatives.

Pour les deux bactéries, le meilleur de résultat d'effaçage est obtenu avec les lipides totaux ou polaires hydrolysés ainsi qu'avec les acides palmitique et oléique. Ceci confirme que l'incorporation des acides gras est plus efficace que les lipides totaux. En effet, comme mentionné dans la section 1.7.1, il a été montré que l'incorporation des lipides totaux est possible, mais avec de faibles taux de marquage (Dowhan et Bogdanov, 2002). Les taux d'incorporation des LTH, LPH et PA dans le cas de *B. subtilis*, sont de 66, 72 et 74%, respectivement. Ces pourcentages sont proches de ceux obtenus par GC-MS dans le cas d'incorporation des lipides deutérés dans *B. subtilis* (60%) (section 4.5.1) et *E. coli* (67%) (section 3.3.1). Cependant, les pourcentages obtenus avec *E. coli* sont plus faibles avec des valeurs de 31 et 43%, avec l'addition de LTH et PA+OA, respectivement (Figure 5.5). Ceci indique que l'effaçage est plus important dans le cas de *B. subtilis*, et cette différence observée entre les deux bactéries pourrait ouvrir des portes sur la différence de la biosynthèse des lipides dans les membranes internes et externes des bactéries à Gram- et à Gram+.

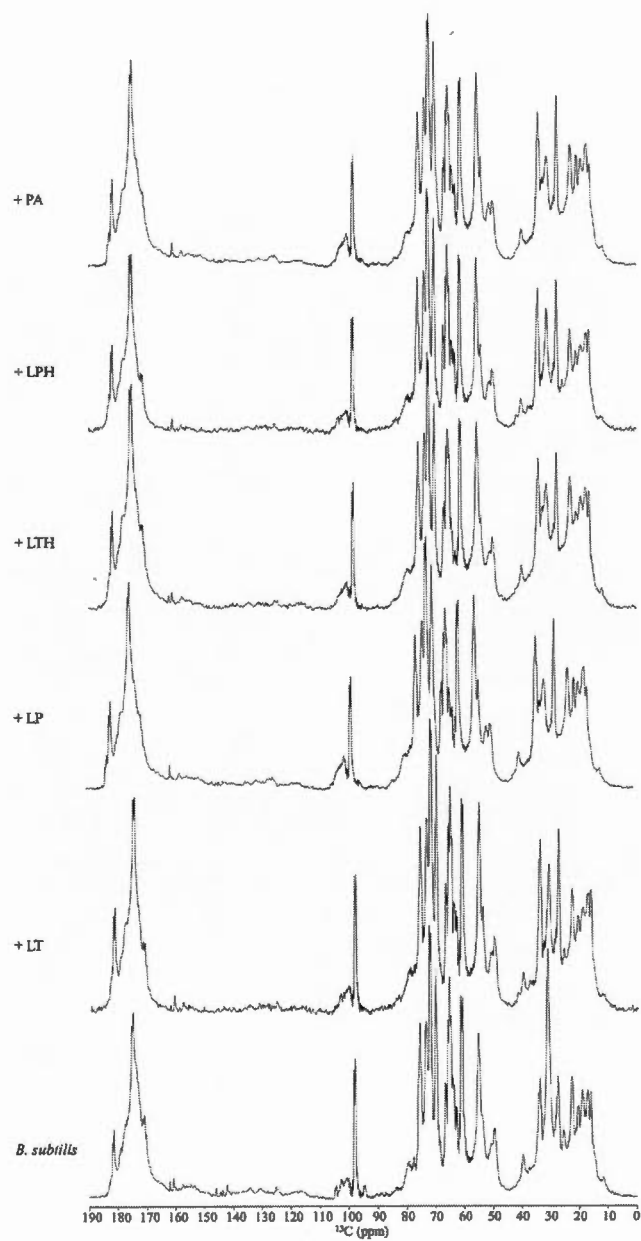


Figure 5.6 Spectres NOE-DP à 10 kHz de *B. subtilis* marquée au ^{13}C dans les différentes conditions de culture.

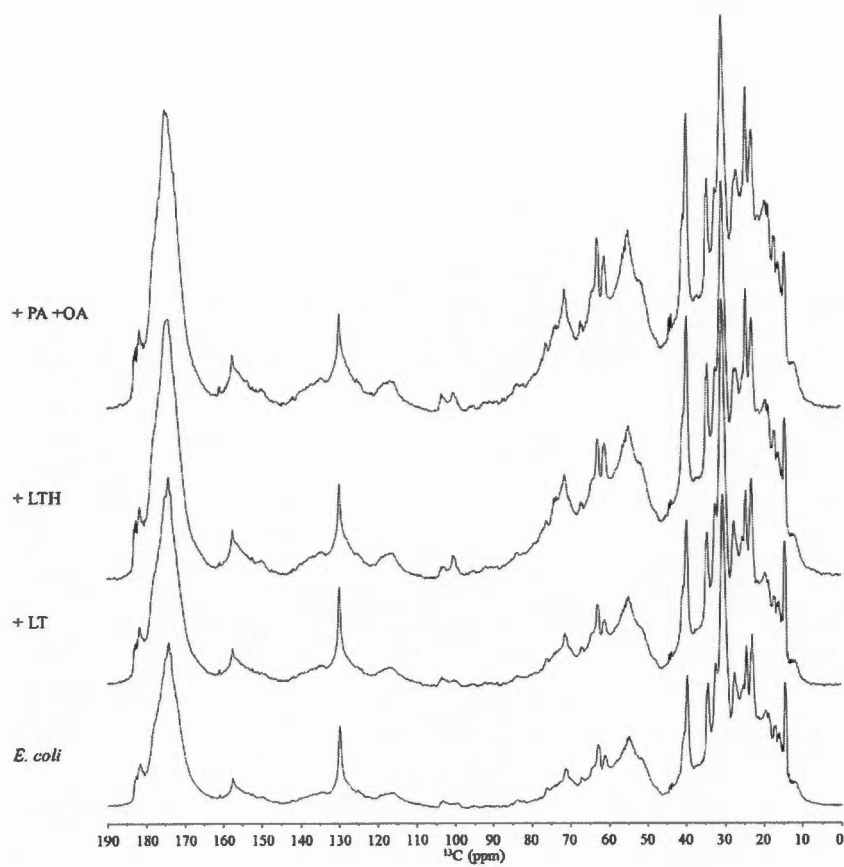


Figure 5.7 Spectres NOE-DP à 10 kHz d'*E. coli* marquée au ^{13}C dans les différentes conditions de culture.

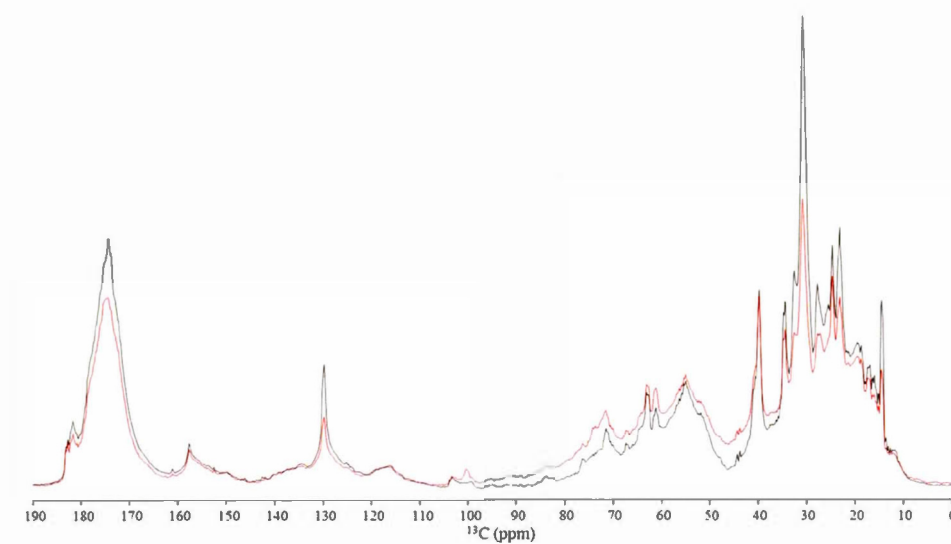


Figure 5.8 Spectres NOE-DP à 10 kHz d'*E. coli* marquée au ^{13}C (en rouge) et d'*E. coli* marquée au ^{13}C en présence de lipides totaux hydrolysés (en noir).

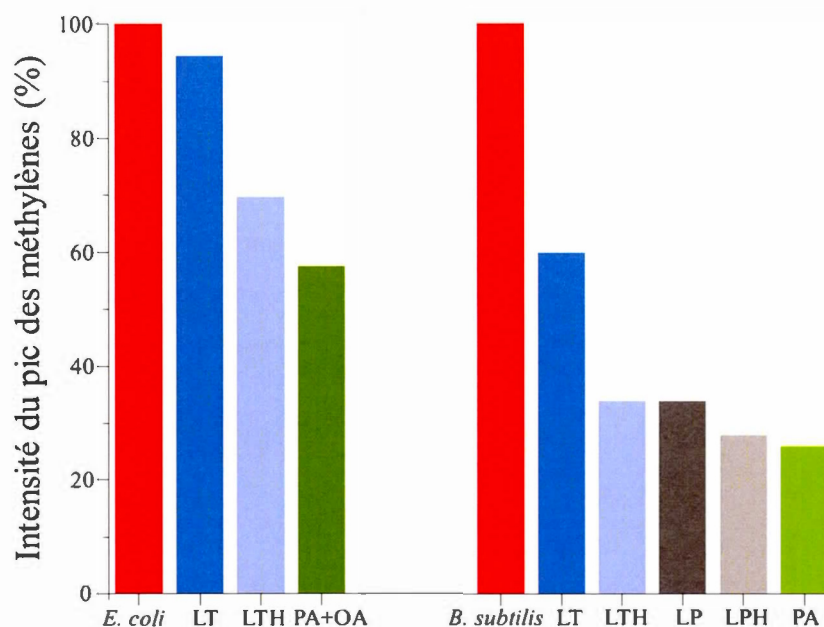


Figure 5.9 Intensité du pic des carbones méthylènes avec un déplacement chimique de 30 ppm pour chaque condition de cultures analysées pour *E. coli* et *B. subtilis*. Il est important de préciser que chaque condition de culture a été réalisée qu'une fois, et que les données présentées sont qualitatives.

5.4 Conclusion

L'étude des bactéries entières par RMN- ^{13}C -1D nous a permis d'attribuer plusieurs carbones des composants bactériens. Des analyses en 2D telle que l'analyse NOE-2D pour la détection des corrélations ^{13}C - ^{13}C seront intéressantes pour l'amélioration de l'attribution. En ce qui concerne la stratégie d'effaçage des lipides, le meilleur taux d'effaçage est observé avec l'incorporation des lipides extraits hydrolysés et celle des acides palmitique et oléique. La purification des lipides polaires

à partir des lipides totaux est donc une étape non nécessaire, contrairement à celle de l'hydrolyse des lipides en acides gras. Bien que le taux d'effaçage qualitatif obtenu est intéressant, cette méthode n'a pas contribué à simplifier les spectres et à faciliter l'attribution complète. D'autres méthodes peuvent être utilisées et ce point sera discuté dans la conclusion. De plus, cette méthode d'effaçage nous a permis d'observer un meilleur taux d'effaçage dans le cas de *B. subtilis*, ce qui pourrait pousser nos travaux vers l'étude de cette différence observée entre les deux bactéries.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

L'objectif de l'ensemble de ce projet était d'étudier par RMN de l'ÉS, les interactions des AMPs avec des bactéries intactes afin de raffiner nos connaissances sur leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. Les travaux publiés sur la caérine 1.1 et l'auréine 1.2, deux AMPs cationiques, ont montré leur activité importante contre les bactéries, et ont raffiné des hypothèses sur leur mécanisme d'action, basées sur l'emploi de membranes modèles. Nous avons débuté le projet par l'optimisation du marquage des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* afin d'étudier leurs lipides membranaires qui représentent le site de l'interaction des AMPs, par la RMN- ^2H . La détermination du profil lipidique des acides gras des bactéries marquées a montré que l'ajout d'OA au PA- d_{31} est nécessaire pour restaurer le profil lipidique d'*E. coli* sauvage (ce qui n'est pas le cas pour *B. subtilis*) et que le pourcentage de marquage pour les deux bactéries peut atteindre 70%. L'obtention, pour les deux bactéries marquées, de profils en AG similaires à ceux de bactéries non marquées, démontre que ce protocole de marquage permet des analyses représentatives des membranes sauvages en RMN. De plus le taux de marquage obtenu a permis un bon rapport signal sur bruit lors des analyses en RMN- ^2H . Cependant, il serait intéressant de déterminer la composition en différents types de phospholipides (PE, PG, CL). En effet, il a été montré qu'en cas de stress (changement de pH, nutriments etc.), la proportion de CL synthétisée par la bactérie augmente (Arechaga *et al.*, 2000; Ianzini *et al.*, 1990; Ingram, 1977; Romantsov *et al.*, 2009; Shibuya, 1992). De plus, il serait intéressant de déterminer la proportion de PAD- $_{31}$

incorporé dans chacun de phospholipides (PE, PG, CL) afin de confirmer le caractère représentatif des membranes sauvages.

La méthode d'analyse par RMN du ^2H a été ensuite optimisée par l'application de la MAS. En effet, la MAS à 10 kHz a permis d'obtenir des informations sur la dynamique des membranes avec un gain en sensibilité et en temps, sans affecter la viabilité cellulaire des bactéries. En effet, il est impératif que les échantillons bactériens soient vivants le plus longtemps possible lors des analyses afin de pouvoir estimer les effets des AMPs de façon *in vivo*. Les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus selon la méthode de réduction du MTT montrent des valeurs proches de 40% après les analyses en statique ou en MAS et ce pourcentage est compatible avec des analyses *in vivo*.

Une fois le marquage et la méthode d'analyse optimisés, la caérine 1.1 et l'auréine 1.2 ont été mises en contact avec les bactéries entières. L'analyse des moments spectraux a montré que les deux peptides augmentent la fluidité membranaire des deux bactéries. Cependant, cet effet est observé à une concentration plus élevée des peptides sur les cellules de *B. subtilis* (Gram+). Ce résultat démontre l'importance de réaliser des analyses sur des cellules intactes par rapport à des membranes modèles. De plus, en se basant sur les différences entre la paroi cellulaire de *B. subtilis* et d'*E. coli* (Gram-), il existerait une interaction électrostatique entre les composants du PGN et les AMPs, plus spécifiquement les TA et LTA chargés négativement, susceptible de modifier la concentration réelle en AMP sur la membrane cellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, il a été nécessaire d'étudier les bactéries par la RMN- ^{13}C afin d'étudier l'interaction des AMPs avec les TA et LTA. Le protocole de marquage au ^{13}C , étant facile et utilisé dans la littérature (Kern *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2008), nous l'avons reproduit sur des cellules d'*E. coli* et de *B. subtilis* afin de les caractériser par la RMN- ^{13}C . Les spectres des bactéries marquées nous ont permis une attribution partielle des carbones en se basant sur les travaux précédents. Pour réaliser une attribution plus complète des composants bactériens, il serait impératif de faire des

analyses en RMN 2D. Cependant, avant ces analyses, nous avons expérimenté dans ce projet l'ajout des lipides et des AGs non marqués pendant la croissance des bactéries en présence du glycérol- $^{13}\text{C}_3$ afin d'éliminer le signal des lipides et simplifier les spectres. Cette méthode a permis la diminution des intensités de la plupart des pics des lipides, mais pas forcément la simplification des spectres.

À ce stade du projet, il serait intéressant de caractériser le PGN purifié des bactéries marquées par des analyses en RMN 2D. Des expériences de REDOR (Rotational-echo double-resonance) en RMN, généralement utilisées dans les études de structure des molécules biologiques (Matsuoka et Inoue, 2009; Toke, 2007), pourraient être appliquées afin d'étudier celle des peptides antimicrobiens et leur localisation en présence du PGN. Par exemple, le REDOR a été précédemment utilisé dans l'analyse structurale de la vancomycine marquée au ^{15}N en présence des cellules entières de *Staphylococcus aureus* et du PGN marqué au ^{13}C (Hing *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2002). Cette stratégie est basée sur la réintroduction du couplage dipolaire hétéronucléaire entre les noyaux ^{13}C et ^{15}N afin de mesurer les distances hétéronucléaires (Ghosh *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2002) et de déterminer par la suite la localisation des peptides dans le PGN. Des analyses pourraient également porter sur la purification des composants du PGN, soit le TA (De Jonge *et al.*, 1992) et les LTA (Ryu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016), afin d'étudier l'éventuelle interaction des AMPs avec ces derniers.

En parallèle, il serait intéressant d'étudier la structure de la caérine 1.1 et l'auréine 1.2 par spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD, *Circular Dichroism*) afin de savoir s'ils se structurent au contact du PGN, étant non structurés en solution aqueuse.

Un autre aspect intéressant à considérer dans les études ultérieures est l'effet des AMPs à la CMI sur *B. subtilis*. On a en fait observé dans le chapitre IV un léger effet de rigidification de la membrane lipidique de *B. subtilis* à la CMI des AMPs. Dans un premier temps, il faudrait s'attarder sur cet effet de rigidification, et examiner si ce

dernier est dû à une faible quantité de peptides à la surface membranaire ou s'il est provoqué suite à l'interaction des AMPs avec le PGN. Pour ce faire, l'utilisation de la microscopie à fluorescence est un outil intéressant pour suivre les AMPs marqués par fluorescence et leur translocation en bactéries *in vivo* (Chao *et al.*, 2012; Fernández-Suárez et Ting, 2008; Taheri-Araghi *et al.*, 2015). Cette technique d'imagerie de fluorescence en temps réel (FLIM, *fluorescence lifetime imaging microscopy*) a été précédemment appliquée à l'étude de l'interaction de la mélittine K14 marquée avec des vésicules unilamellaires de DPPC et avec des bactéries intactes d'*E. coli* transfectées avec de la protéine fluorescente verte (GFP, Green Fluorescent Protein) (Gee *et al.*, 2013).

Cette technique a permis d'estimer la quantité de peptide libre en solution, associée aux membranes et celle qui participe à la formation des pores. Ainsi, le suivi de la cinétique de l'interaction a indiqué la formation des pores par la mélittine K14, mais aussi une perte du contenu cytoplasmique par la diminution de la fraction de la protéine fluorescente verte dans le cas des bactéries.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'examiner la viabilité cellulaire et les aspects morphologiques des cellules bactériennes à ce stade de l'interaction. Ainsi, les tests de MTT pourraient être effectués sur *B. subtilis* après la mise en contact des AMPs à la CMI pendant 5 min (Wang, H. et al., 2010) afin de vérifier si la croissance bactérienne est affectée sans que leur mode d'action soit exercé sur les membranes lipidiques, l'observation de la morphologie de *B. subtilis* peut être effectuée par la microscopie à transmission électronique (Hartmann *et al.*, 2010) et des mesures topologiques par microscopie à force atomique (AFM, *atomic force microscopy*) permettraient l'observation *in vivo* et à une échelle nanométrique les effets des AMPs sur la forme, la texture et la rugosité des cellules (Braga et Ricci, 1998; Dufrêne, 2002; Mularski *et al.*, 2015).

Pour conclure, ce projet a donc permis de mettre en évidence l'aspect novateur de la RMN-ÉS *in vivo* qui est un outil intéressant pour étudier le mode d'action des AMPs au niveau moléculaire. Le protocole de deutération d'*E. coli* non mutée avec l'ajout de l'OA a été optimisé dans ce projet, et celui de *B. subtilis* a été réalisé pour la première fois. Les études réalisées en MAS sur *B. subtilis* et *E. coli* nous ont permis de raffiner le mécanisme d'action des deux AMPs, la caérine 1.1 et l'auréine 1.2, schématisé dans la Figure 6.1. Cette dernière montre l'importance d'étaler les études de l'interaction de ces AMPs avec les composants du PGN.

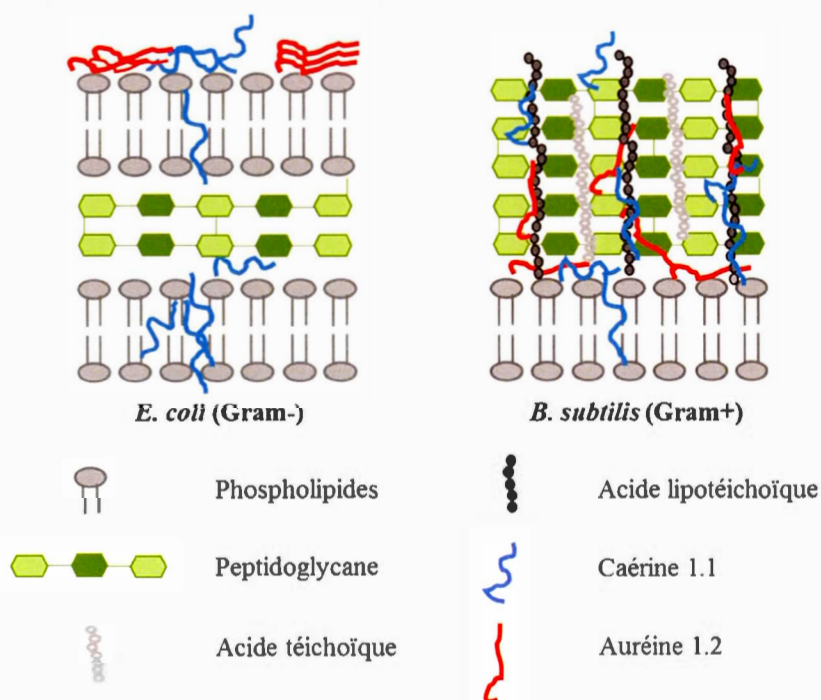


Figure 6.1 Schématisation du mécanisme d'action de la caérine 1.1 et de l'auréine 1.2.

ANNEXE

- A.1 Article publié dans *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (2016), 146-152
- A.2 Article publié dans *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (2016), 2959-2964



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

A ^2H magic-angle spinning solid-state NMR characterisation of lipid membranes in intact bacteria

Xavier L. Warnet^a, Marwa Laadhari^b, Alexandre A. Arnold^b, Isabelle Marcotte^b, Dror E. Warschawski^{a,*}^a UMR 7099, CNRS - Université Paris Diderot, BPIC, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France^b Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, Canada, H3C 3P8

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2015

Received in revised form 6 October 2015

Accepted 26 October 2015

Available online 28 October 2015

Keywords:

In cell solid-state nuclear magnetic resonance

Deuterium NMR

Bacteria

Lipids

Dynamics

ABSTRACT

This work proposes a new approach to characterize cell membranes in intact cells by ^2H solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) in only a few hours using magic-angle spinning (MAS) and spectral moment analysis. The method was first validated on model dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membranes, allowing the detection of lipid fluctuations below the main transition temperature. Then the lipid dynamics in *Escherichia coli* membranes was compared in bacteria grown under different diets. More specifically, deuterated palmitic acid was used to isotopically label the phospholipid acyl chains in bacteria membranes, with or without the presence of protonated oleic acid. Our results showed improved lipid fluidity when bacteria were grown in the presence of oleic acid, which helps preserving the natural fatty acid profile in *E. coli* membranes. The MAS ^2H solid-state NMR study of membranes combined with spectral moment analysis showed to be a fast method compatible with *in vivo* bacterial studies, and should also be applicable to other micro-organisms to obtain molecular information on living cells by solid-state NMR.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since the early 2000s, nuclear magnetic resonance (NMR) has proven useful for *in-cell* structural studies of small soluble proteins [1,2]. The goal of these studies was not to determine protein structures, but rather to extract structural and dynamical information, as well as to identify potential interactions with other cellular components. Recently, two studies [3,4] showed that *in-cell* solid-state NMR (ss-NMR) could also be a powerful tool to study membrane proteins in their natural environment, as well as their interactions with lipids. These interactions could also be characterized by complementary experiments developed long ago, using *in-cell* solid-state NMR of lipids [5].

The first applications of static ^2H ss-NMR to lipids and cell membranes (*Acholeplasma laidlawii*) date back to the early 1970s [6,7] but

the introduction of the 90° solid echo in 1976 improved significantly the quality of static wide-line ^2H ss-NMR spectra [8,9] whose lineshapes are sensitive to molecular order, dynamics and therefore molecular interactions. Mutated strains of *Escherichia coli* lacking fatty acid oxidation were grown with exogenous deuterated fatty acids [10,11] until Tardy-Laporte et al. showed that it was possible to label wild-type *E. coli* membranes [12]. ^2H NMR order parameters and spectral moments were measured to deduce biologically-relevant structural and dynamic parameters in all sorts of synthetic and biological membranes up until today. For example, Tardy-Laporte et al. studied the effect of antimicrobial agents on cell membrane lipids, and proposed that fullereneol interacted with lipopolysaccharides of the outer membrane of *E. coli* [12].

Nevertheless, such studies, although non-invasive, can be time consuming (at least several hours to obtain a sufficient signal-to-noise ratio) which can be deleterious for some perishable samples. An approach to speed up these experiments is to combine them with magic-angle spinning (MAS). While the first combination of ^2H ss-NMR and MAS dates back to the late 1970s [13,14], it is only in 1986 that Clayden suggested that MAS can provide similar information to static ^2H ss-NMR with better sensitivity [15]. The analysis of ^2H MAS sideband linewidths to extract dynamic information were developed in the late 1990s [16,17] and found an important application in the case of membranes, where it has been used to probe critical fluctuations in model membranes. Indeed, Radhakrishnan and McConnell [18] predicted that these critical fluctuations would be measurable either on

Abbreviations: (MTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; (d_{62} -DPPC), Deuterated dipalmitoyl phosphocholine; (d_{31} -PA or $d_{C16:0}$), Deuterated palmitic acid; (DPPC), Dipalmitoyl phosphocholine; (DOPC), Dioleoyl phosphocholine; (DPC), Dodecyl phosphocholine; (MAS), Magic-angle spinning; (NMR), Nuclear Magnetic Resonance; (ss-NMR), Solid-state NMR; (C14:0), Myristic acid; (C15:1), Pentadecenoic acid; (PA or C16:0), Palmitic acid; (C16:1), Palmitoleic acid; (cyC17:0), Cyclopropyl heptadecanoic acid; (C18:0), Stearic acid; (OA or C18:1), Oleic acid; (C19:0), Nonadecanoic acid.

* Corresponding author at: UMR 7099, BPIC, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France.

E-mail address: Dror.Warschawski@bpc.fr (D.E. Warschawski).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.020>
0005-2736/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

the relaxation of ^2H MAS NMR spectra or on its sideband linewidths and both effects have been verified and quantified [19,20]. However, this method has not yet been applied to the study of membranes in intact cells. Therefore in this study, we assessed the advantages of using MAS vs. static ^2H NMR to study lipids within their native environment such as intact cellular membranes. More specifically, we showed how spectral moment analysis can be used to analyse spectra obtained with MAS. This approach was tested on model systems as well as on bacteria grown on different diets.

2. Material and methods

2.1. Materials

Deuterated dipalmitoyl phosphocholine (d_{62} -DPPC) and dodecyl phosphocholine (DPC) were acquired from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Oleic acid (OA), deuterated palmitic acid (d_{31} -PA), deuterium-depleted water and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MI, USA).

All NMR experiments were performed on a solid-state Bruker Avance III-HD wide bore 400 MHz spectrometer (Milton, Ontario, Canada), operating at a frequency of 61 MHz for deuterium, with double resonance magic-angle spinning probes using either 4 mm or 1.9 mm diameter rotors.

2.2. Sample preparation

DPPC samples were prepared with a 75% hydration content by mixing 22 mg of d_{62} -DPPC with 66 mg of ^2H -depleted water, transferred into a 4 mm rotor, or 2.75 mg of d_{62} -DPPC with 8.25 mg of ^2H -depleted water, transferred into a 1.9 mm rotor.

BL21 strain *E. coli* bacteria were grown as described before [12], with 0.19 mM d_{31} -PA incorporated in the growth medium. Another culture was prepared, incorporating 0.19 mM d_{31} -PA and 0.19 mM OA. NMR experiments were carried out on fresh samples pelleted and transferred into 4 mm rotors.

2.3. Sample characterisation

Lipid profile analyses by gas phase chromatography combined with mass spectrometry, and cellular viability assays by MTT reduction were performed as described in [12].

2.4. NMR

Static spectra were obtained using the solid-echo pulse sequence [8], with a 90° pulse length of 4 μs and an interpulse delay of 40 to 60 μs . Typically, 10 k points were acquired with a dwell time of 0.5 μs (spectral width of 1 MHz) and a repetition delay of 500 ms. The number of transients accumulated were 10,000 (1.5 h) vs. 20,000 (3 h) for DPPC

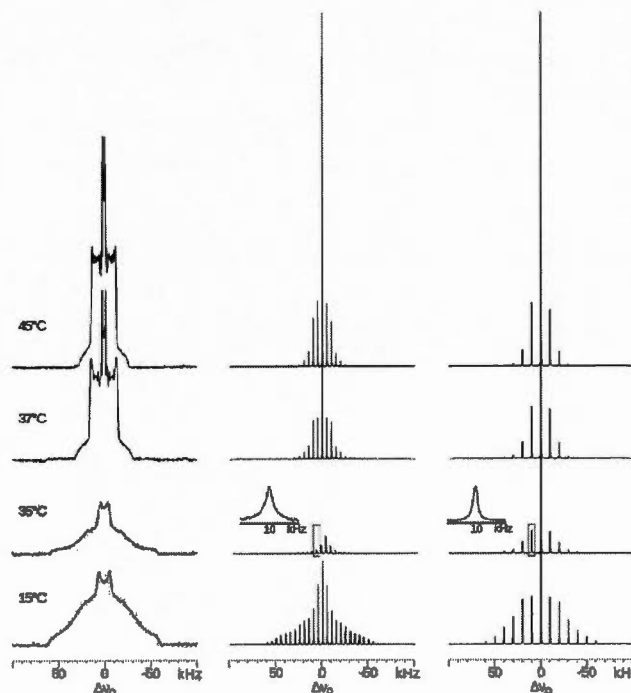


Fig. 1. Static and MAS (5 and 10 kHz) ^2H ss-NMR spectra of d_{62} -DPPC at 25°C, 35°C, 37°C and 45°C. Static spectra were obtained with 10k scans. MAS spectra were obtained with 1k scans.

and *E. coli* samples respectively. Processing was performed by using only 2000 points, left shifting by a couple of points to start from the top of the echo, automatic baseline correction and a line broadening of 20 Hz.

Spectra acquired at 5 or 10 kHz MAS frequencies were obtained using a modified Hahn-echo pulse sequence [15,21], with an initial 45° pulse and an interpulse delay equal to one rotor period (100 or 200 μs). Typically, 128 k points were acquired with a dwell time of 1 μs (spectral width of 500 kHz) and a repetition delay of 500 ms. The number of transients accumulated with MAS were 1000 (10 min) vs. 2000 (20 min) for DPPC vs. *E. coli* samples respectively. Processing was performed by using only 64 k points, left shifting by a couple of points to start from the top of the echo, automatic baseline correction and 20 Hz line broadening.

Experiments on model membranes were also performed on a 1.9 mm magic-angle spinning probe, at 10 or 20 kHz spinning frequency, with a 2.5 μs 90° pulse and an un-modified Hahn-echo pulse sequence. Temperature was calibrated and corrected at each spinning speed with ethylene glycol [22]. The equilibration time, in case of multi-temperature experiments, was 15 min.

2.5. Moment calculation

The second moment M_2 can be calculated using Eq. (1) [23], ν_Q being the motionless quadrupolar splitting and S_D^2 the mean square order parameter.

$$M_2 = \frac{\int_0^\infty \omega^2 f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega} = \frac{4\pi^2 \nu_Q^2}{5} \langle S_D^2 \rangle \quad (1)$$

As shown by Maricq and Waugh [13], the spreading of the deuterium spectrum into spinning sidebands allows for a more simple way to extract spectral moments (see Eq. (2)), ω_r being the spinning rate ($\omega_r = 2\pi\nu_r$, where ν_r is expressed in Hz) and A_N being the area of the N th sideband.

$$M_2 = \omega_r^2 \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^2 A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N} \quad (2)$$

Spectral moments were either calculated according to Eq. (1), using the matNMR software [24], or Eq. (2), using any commercial or open source pick-picking software (Bruker Topspin or the aforementioned matNMR software) and spreadsheet application, such as LibreOffice Calc.

3. Results and discussion

The use of MAS guarantees an increase in sensitivity for solid-state NMR, which is of crucial interest for ^2H NMR of biological samples that are diluted and have to be studied while fresh to avoid degradation. Indeed, cellular viability assay by MTT reduction indicated a decrease of *E. coli* viability from 70% after 1 h down to 30% after 15 h, and this decrease was almost not affected by MAS (Table S1). In order to establish the feasibility of *in cell* magic-angle spinning ^2H NMR, the similarity and precision of the information extracted by MAS compared to the one obtained with static ^2H NMR had to be verified. We have therefore first studied artificial membranes made of d_{62} -DPPC (perdeuterated on their acyl chains), which behaviour is well known [23].

A side advantage of using MAS is that echoes or alternative sequences to remove the effects of deadtime and acoustic ringing [25,26] are not essential, provided signal is detected from the top of the first rotational echo, which implies signal loss at slow spinning frequencies. Using echoes in MAS is nevertheless possible, if synchronised with the rotor period, and using a 180° Hahn echo after one rotor period [20] proved beneficial for retrieving sensitivity and improving the spectral baseline. Because the radio-frequency power available on the ^2H channel for a standard 4 mm probe is usually insufficient for uniform excitation of a broad ^2H spectrum, the classical Hahn echo sequence was modified by replacing the initial 90° pulse by a 45° pulse, as suggested by Bloom and Clayden [15,21]. This results in a slight decrease in sensitivity but allows a uniform excitation profile across the whole spectrum width.

We have first verified that, as expected, sensitivity was greatly increased by MAS. A good quality spectra can thus be obtained in 15 min (see Fig. 1). While temperature was carefully calibrated and corrected at all spinning rates, we noticed that, in a 4 mm diameter rotor, the heating induced by spinning was around 2 °C at 5 kHz, and around 5 °C at 10 kHz. Increasing the rotor spinning frequency increases the sensitivity, reduces the echo time loss, but also increases the heating by friction and reduces the number of spinning sidebands from which spectral moments can be extracted. According to Eq. (2), although an infinitely fast rotation would result in no spinning sideband and no possible moment measurement, an accurate moment can be measured with only one sideband, provided its intensity is large enough. However, with a small number of sidebands, the impact of the smallest sideband to the error in moment measurement may become crucial. A compromise must be found and our experiments showed us that, provided the signal-to-noise was good enough, a few spinning sidebands were sufficient to provide accurate moment values. In practice, spinning frequencies between 5 and 20 kHz were appropriate. The gain in sensitivity in such conditions was between one and two orders of magnitude (see Figure S1 in the Supplementary Information), while the error remained below 10% with only two sidebands remaining at high temperatures (see Figure S2 in the Supplementary Information).

On Fig. 1, we observe a severe ^2H NMR line broadening in d_{62} -DPPC, slightly below its main phase transition temperature of 37 °C. In the static case, the reduction of signal-to-noise ratio is visible at around 35 °C (Fig. 1 and Figure S3). Under MAS, the line width of the isotropic band and of each sideband was monitored, and broadening occurred

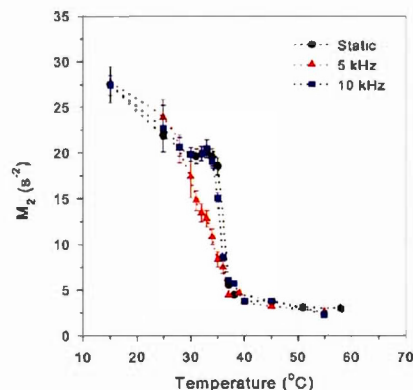


Fig. 2. Plots of M_2 from ^2H ss-NMR spectra of d_{62} -DPPC as a function of temperature. Eq. 1 was used for the static sample (circles). Eq. 2 was used for 5 kHz (triangles) and 10 kHz (squares) spinning.

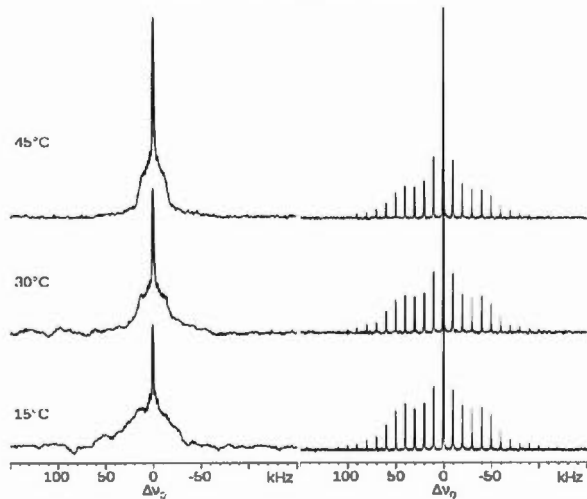


Fig. 3. Static and MAS (at 10 kHz) ^2H NMR spectra of *E. coli* incorporating d_{11} -PA at 15 °C, 30 °C and 45 °C. Static spectra were obtained with 20 k scans (3 h). Spinning spectra were obtained with 2 k scans (20 min).

ca. 34 °C. Since the same dynamic process seems to be responsible for broadening of static and spinning samples, interference of molecular motion with the rotor rotation cannot be solely responsible for such observed broadening [15,27]. Nevertheless, MAS allows for easy line width assessment and, as can be seen in Fig. 1, broadening is greater at 5 than at 10 kHz. To rule out the sole effect of the Hahn echo (longer at 5 kHz than at 10 kHz), spectra were also acquired without any echo, showing the same tendency (see Figure S4), pointing towards a low frequency dynamic process interfering with low frequency rotation of the rotor. This type of spectral broadening has been reported in the case of critical fluctuations in DOPC/ d_{67} -DPPC/cholesterol mixtures at around 29 °C,

and has been assigned primarily to global lipid lateral diffusion effects [19,20,28]. Fluctuations, induced by the temporary coexistence of lipid clusters in different phases, have also been reported in simpler lipid mixtures, including local motion due to progressive acyl-chain melting in what has been called the sub-main transition region [29–31]. More work will be necessary to precisely identify the global and local molecular motion responsible for such increased relaxation and broadening. Individual local order parameters cannot be measured when the distribution of ^2H labels and quadrupolar splittings is broad, as is the case with deuterated biological samples. In such cases, moment analysis is a good alternative since ^2H NMR spectral moments are related to the averaging of quadrupolar interactions by chain motion, as the mean order parameters would be. In particular the second moment M_2 is directly related to the mean square order parameter S^2_{CD} (see Eq. (1)), and thereby provides a convenient global picture of the state of the membrane. In d_{62} -DPPC, the static ^2H NMR M_2 decreases from $40 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ to $3 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ when the temperature increases from 0 °C to 50 °C, with a sharp transition at the phase transition temperature of 37 °C [23]. A similar variation is observed in bacterial membranes grown on d_{31} -PA [10,12].

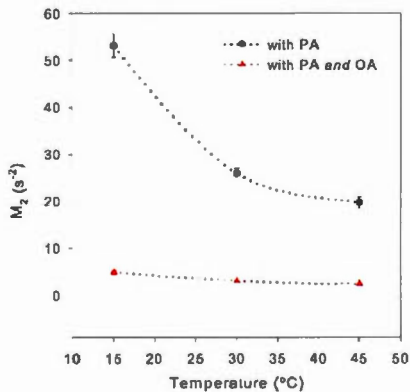


Fig. 4. Plots of M_2 from ^2H ss-NMR spectra of *E. coli* incorporating d_{11} -PA, with (triangles) and without (circles) protonated OA, as a function of temperature for 10 kHz spinning, using Eq. (2).

Table 1
Average proportion of the major fatty acid chains in *E. coli* phospholipids under various growth conditions, determined by gas chromatography–mass spectrometry. Cyclopropane fatty acids are counted as unsaturated.

	No enrichment	With exogenous dC16:0	With exogenous dC16:0 and C18:1
C14:0	2%	1%	1%
C15:1	5%	5%	0%
C16:0	39%	55% (69% deuterated)	45% (67% deuterated)
C16:1	1%	3%	6%
cyC17:0	13%	11%	14%
C18:0	2%	2%	1%
C18:1	31%	14%	23%
C19:0	2%	1%	2%
others	5%	9%	8%
Total saturated	48%	60%	51%
Total unsaturated	52%	40%	49%

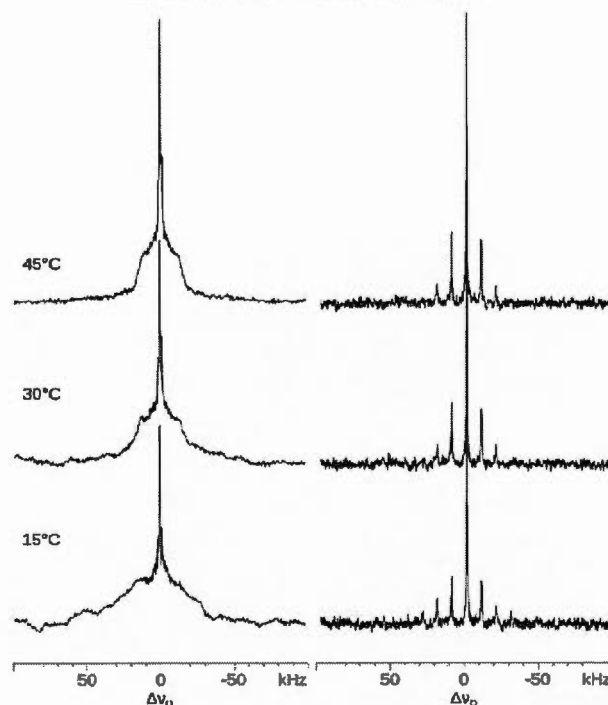


Fig. 5. Static and MAS (at 10 kHz) ^2H NMR spectra of *E. coli* incorporating d_{31} -PA and protonated OA at 15 °C, 30 °C and 45 °C. Static spectra were obtained with 20 k scans. Spinning spectra were obtained with 2 k scans.

Using magic angle spinning, we measured ^2H NMR M_2 values for d_{31} -DPPC which were identical to the same static sample and to literature values [23], at temperatures between 15 °C and 55 °C, and at spinning frequencies of 5 kHz and 10 kHz (Fig. 2). Although our static spectra could only be analysed with continuous integration (Eq. (1)), our spinning results were analysed using both the continuous integration and the simpler discrete sideband integration (Eq. (2)), with the same results, provided the number of sidebands and their intensities were sufficient (a minimum of 2 sidebands ensures an error below 10%). Although M_2 should be invariant to sample rotation [13], which is what we observe if we compare the static and the 10 kHz traces, we see a slight discrepancy at 5 kHz, between 28 and 36 °C. We believe this results from the line broadening discussed previously, which may affect the measurement of the low intensity sidebands, and in turn affect the accuracy of the measured moment. A more precise measurement could be obtained by accumulating more, thereby losing the advantage of fast acquisition. Alternatively, we have preferred spinning at 10 kHz in the rest of the article.

Once the approach was validated with DPPC membranes, we have applied ^2H MAS NMR to real biological cells. Our first biological sample was made of intact wild-type *E. coli* cells, incorporating d_{31} -PA ($d_{16:0}$), tested at several temperatures and at a spinning of 10 kHz (Fig. 3). A good ^2H signal-to-noise ratio, with a very good baseline, was obtained in twenty minutes instead of 3 h for a static spectrum. An automatic pick-picking routine was applied to the spectra, allowing for a quick

and easy measurement of M_2 as a function of temperature. By probing just three different temperatures (15 °C, 30 °C, 45 °C), the membrane rigidity and its variation could be characterized in less than two hours (Fig. 4), and agreed well with known data [12]. This protocol is compatible with *in vivo* solid-state NMR studies of bacteria, as shown by our viability assays, and by other groups [32].

In our previous work [12], we have shown by gas phase chromatography that a widespread *E. coli* strain such as BL21 was able to incorporate d_{31} -PA. We have also checked that PA was the most abundant fatty acid present, and that a significant amount could be deuterated using our protocol. d_{31} -PA is therefore a good probe to reflect the behaviour of the majority of bacterial membrane lipids. Nevertheless, we have shown that incorporation of exogenous PA reduced the amount of unsaturated fatty acids in the bacterial membrane. Because this may alter the membrane rigidity or its phase transition temperature, we thus proceeded to grow wild-type *E. coli* cells with d_{31} -PA in the medium, in presence of an equal amount of protonated OA (C18:1).

Here we show by gas phase chromatography that indeed, the addition of OA mostly restores the wild-type proportion of saturated and unsaturated fatty acids, thereby probably better reflecting the natural fluidity of the bacterial membrane (Table 1). We observe here that the most abundant fatty acids are C16:0, C18:1 and cycC17:0 (cyclopropane derivative, often misassigned as C17:1 [33,34]). The samples studied here contain a very low proportion of palmitoleic acid (C16:1), in disagreement with some studies [10,12] but in agreement with others

[35]. The addition of protonated OA slightly reduces the amount of deuterated lipids in the sample, and hence the sensitivity of the method, but it hardly reduces the proportion of deuterated PA (around 70%) which remains the most abundant fatty acid in the membrane.

Following the protocol described above, we analysed in less than two hours the bacterial membranes grown on dC16:0 and C18:1 to assess the effect of OA. While an obvious effect is the reduced deuterium signal-to-noise ratio due to the increased number of protonated fatty acids, the other visible effect is a narrower distribution of quadrupolar splittings indicating a lower rigidity (Fig. 5). This effect was confirmed by the extracted M_2 values (Fig. 4) indicating that *E. coli* grown only on PA was mostly in the gel phase, with a higher proportion of fluid phase as the temperature was raised, whereas *E. coli* grown on both palmitic and oleic acids was always in the fluid phase, as expected for most wild-type bacteria [36].

4. Conclusions and perspectives

Lipids constitute half the weight of biological membranes and their structural diversity signals a variety of functions that is worth exploring [37]. We have herein established a new approach to characterize membrane lipids in intact cells in a few hours, thus reducing the possibility of sample degradation and allowing for *in vivo* studies of bacteria. This protocol combines ^2H solid-state NMR, magic-angle spinning and spectral moment analysis, and it was first validated on model membranes, allowing the detection of molecular fluctuations below the main phase transition temperature. We have extended this method to *E. coli* bacteria grown on deuterated palmitic acid, with or without the presence of protonated oleic acid, showing that membrane fluidity was related to the diet that the bacteria were grown on.

We anticipate that our approach will prove valuable in providing information regarding other diet-induced changes, lipid-protein interactions or membrane curvature, helping to characterise membranes that are not as well known, for example of algae, fungi or worms grown on different fatty acids [38–40]. Thereby, solid-state NMR is exploring yet a new frontier of structural biology by tackling *in-cell* (in some cases even *in vivo*) biomolecular studies, strengthening the link between molecular structure, dynamics and function [41–42].

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS (UMR 7099), the Université Paris Diderot, the Labex Dynamo (ANR-11-LABX-0011-01), and the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Canadian Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP) are acknowledged for the award of scholarships to X.L.W. and M.L., respectively. We would like to thank Mathieu Babin for the gas phase mass spectrometry, and Prof. Jim ^2H Davis for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data includes cellular viability assays (Table S1) and ^2H NMR sensitivity, error and line width measurements as a function of spinning rate and temperature (Fig. S1, S2, S3 and S4). Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2015.10.020>.

References

- [1] Z. Serber, A.T. Keatinge-Clay, R. Ledwidge, A.E. Kelly, S.M. Miller, V. Dösch, High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2446–2447.
- [2] A.V. Maldonado, D.S. Burz, A. Sheldman, In-cell NMR spectroscopy, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 59 (2011) 197–212.
- [3] R. Fu, X. Wang, C. U. A.N. Santiago-Miranda, G.J. Pielak, F. Tian, In situ structural characterization of a recombinant protein in native *Escherichia coli* membranes with solid-state magic-angle spinning NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 12370–12373.
- [4] M. Renaut, R. Tommassen-van Boxtel, M.P. Bos, J.A. Post, J. Tommassen, M. Baldus, Cellular solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 4863–4868.
- [5] R.E. Jacobs, E. Oldfield, NMR of membranes, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 14 (1981) 113–136.
- [6] E. Oldfield, D. Chapman, W. Derbyshire, Deuteron resonance – novel approach to study of hydrocarbon chain mobility in membrane systems, *FEBS Lett.* 16 (1971) 102–104.
- [7] E. Oldfield, D. Chapman, W. Derbyshire, Lipid mobility in acholeplasma membranes using deuteron magnetic resonance, *Chem. Phys. Lipids* 9 (1972) 69–81.
- [8] J.H. Davis, K.R. Jeffrey, M. Bloom, M.L. Valic, T.P. Higgs, Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains, *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976) 390–394.
- [9] G.W. Stockton, K.G. Johnson, K.W. Butler, A.P. Tulloch, Y. Boulanger, I.C. Smith, J.H. Davis, M. Bloom, Deuteron NMR study of lipid organization in acholeplasma *laidlawii* membranes, *Nature* 269 (1977) 267–268.
- [10] J.H. Davis, C.P. Nichol, G. Weeks, M. Bloom, Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuteron magnetic resonance, *Biochemistry* 18 (1979) 2103–2112.
- [11] J. Plus, M.R. Morow, V. Booth, ^2H solid-state NMR investigation of whole *Escherichia coli* interacting with antimicrobial peptide MSI-78, *Biochemistry* 51 (2012) 118–125.
- [12] C. Tardy-Laporte, A.A. Arnold, B. Genard, R. Gasthous, M. Morancals, J.L. Mouget, R. Tremblay, I. Marcotte, A H-2 solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 614–622.
- [13] M.M. Maricq, J.S. Waugh, NMR in rotating solids, *J. Chem. Phys.* 70 (1979) 3300–3316.
- [14] J.L. Ackerman, R. Eckman, A. Pines, Experimental results on deuteron NMR in the solid-state by magic angle spinning, *Chem. Phys.* 42 (1979) 423–428.
- [15] N.J. Clayden, Computer simulations of H-2 MAS NMR spinning side band spectra, *Chem. Phys. Lett.* 131 (1986) 517–521.
- [16] M.J. Duer, C. Stourton, H-2 double-quantum NMR spectroscopy for the study of molecular motion in solids, *J. Magn. Reson.* 129 (1997) 44–52.
- [17] M. Cutajar, S.E. Ashbrook, S. Wimpers, H-2 double-quantum MAS NMR spectroscopy as a probe of dynamics on the microsecond timescale in solids, *Chem. Phys. Lett.* 423 (2006) 276–281.
- [18] A. Radhakrishnan, H. McConnell, Composition fluctuations, chemical exchange, and nuclear relaxation in membranes containing cholesterol, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 185101.
- [19] S.L. Veatch, O. Soubias, S.L. Keller, K. Gawrisch, Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 17650–17655.
- [20] J.H. Davis, L. Ziani, M.L. Schmidt, Critical fluctuations in DOPC/DPPC-d(62)/cholesterol mixtures: H-2 magnetic resonance and relaxation, *J. Chem. Phys.* 139 (2013) 045104.
- [21] M. Bloom, J.H. Davis, M.L. Valic, Spectral distortion effects due to finite pulse widths in deuteron nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1510–1517.
- [22] D.S. Ralford, C.L. Fisk, E.D. Becker, Calibration of methanol and ethylene-glycol nuclear magnetic resonance thermometers, *Anal. Chem.* 51 (1979) 2050–2051.
- [23] J.H. Davis, Deuteron magnetic resonance study of the gel and liquid-crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine, *Biophys. J.* 27 (1979) 339–358.
- [24] J.D. van Beek, *maNMR*: a flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®, *J. Magn. Reson.* 187 (2007) 19–26.
- [25] C. Jaeger, F. Hemmann, EASY: a simple tool for simultaneously removing background, deadtime and acoustic ringing in quantitative NMR spectroscopy – part I: basic principle and applications, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 57–58 (2014) 22–28.
- [26] C. Jaeger, F. Hemmann, EASY: a simple tool for simultaneously removing background, deadtime and acoustic ringing in quantitative NMR spectroscopy. Part II: improved ringing suppression, application to quadrupolar nuclei, cross polarisation and 2D NMR, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 63–64 (2014) 13–19.
- [27] D. Suwelack, W.P. Rothwell, J.S. Waugh, Slow molecular motion detected in the NMR spectra of rotating solids, *J. Chem. Phys.* 73 (1980) 2559–2569.
- [28] J.K. Banigan, A. Geyer, N.J. Traaseth, Correlating lipid bilayer fluidity with sensitivity and resolution of polytopic membrane protein spectra by solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1848 (2015) 334–341.
- [29] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, T. Isaac, Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 311 (1973) 330–348.
- [30] L. Cruzeiro-Hanson, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces, *Biochim. Biophys. Acta* 979 (1989) 166–176.
- [31] M. Nielsen, L. Miao, J.H. Ipsen, K. Jørgensen, M.J. Zuckermann, O.G. Mouritsen, Model of a sub-main transition in phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1283 (1996) 170–176.
- [32] G. Zandomeni, K. Hg, M. Arbi, B.H. Meier, On-cell MAS NMR: physiological clues from living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17513–17519.

- [33] D.F. Silbert, F. Ruch, P.R. Vagelos, Fatty acid replacements in a fatty acid auxotroph of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 95 (1968) 1658–1665.
- [34] D. Ourset, C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris, C.M. Lange, Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1721–1728.
- [35] R.D. Mavis, P.R. Vagelos, The effect of phospholipid fatty acid composition on membranous enzymes in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 652–659.
- [36] S. Morein, A. Andersson, L. Rullors, G. Lindblom, Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6801–6809.
- [37] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124.
- [38] R.T. Branca, W.S. Warren, In vivo NMR detection of diet-induced changes in adipose tissue composition, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 833–839.
- [39] I.A. Müller, R.P. Ross, W.F. Sybesma, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, Modification of the technical properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by supplementing the growth medium with unsaturated fatty acids, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 6889–6898.
- [40] M.L. Deline, T.J. Vrablik, J.L. Watts, Dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids in *Caenorhabditis elegans*, *J. Vis. Exp.* 81 (2013), e50879.
- [41] V. Sarou-Kanian, N. Joudiou, F. Louat, M. Yon, F. Szeremeta, S. Méme, D. Massiot, M. Decoville, F. Fayon, J.-C. Beloeil, Metabolite localization in living *Drosophila* using high resolution magic angle spinning NMR, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9872.
- [42] A.J. Simpson, Y. Liaghati, B. Fortner-McGill, R. Soong, M. Akhter, Perspective: in vivo NMR – a potentially powerful tool for environmental research, *Magn. Reson. Chem.* 53 (2015) 686–690.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by ^2H solid-state NMR

Marwa Laadhari^a, Alexandre A. Arnold^a, Andrée E. Gravel^a, Frances Separovic^b, Isabelle Marcotte^{a,*}

^a Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal H3C 3P8, Canada
^b School of Chemistry, Bio21 Institute, University of Melbourne, VIC 3010, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2016
 Received in revised form 11 August 2016
 Accepted 12 September 2016
 Available online 14 September 2016

Keywords:

Gram-positive and Gram-negative bacteria
Escherichia coli
Bacillus subtilis
 In-cell NMR
 Membrane interactions
 Action mechanism

ABSTRACT

Nuclear magnetic resonance (NMR) is commonly used to probe the effect of antimicrobial agents on bacterial membranes using model membrane systems. Ideally, considering the complexity of membranes, the interaction of molecules with membranes should be studied *in vivo*. The interactions of two antimicrobial peptides (AMPs) with intact *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were investigated using deuterium solid-state NMR. Specifically, we studied caerin 1.1 and aurein 1.2 isolated from the skin of Australian tree frogs. The minimal inhibitory concentration value for *E. coli* and *B. subtilis* was about 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for both peptides. A protocol to deuterate the membrane phospholipids of non-mutated *B. subtilis* was established using deuterated palmitic acid. ^2H NMR spectra combined with spectral moment analysis support the interaction of the two AMPs with the hydrophobic core of the bacterial membranes. The presence of peptides decreased the order of the lipid acyl chains for both *E. coli* and *B. subtilis*, but at higher peptide concentrations for the Gram(+) bacteria. This may be explained by the presence of other cell wall components, such as the negatively-charged teichoic and lipoteichoic acids in the peptidoglycan, which would interact with the AMPs and decrease their actual concentration on the membrane surface. The mechanism of action of the AMPs thus depends on their local concentration as well as the membrane environment. The differences between the AMPs interaction with *E. coli* and *B. subtilis* reveal the importance of studying intact bacteria.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Excessive use of antibiotics, estimated of about 100,000 t annually, has led to the emergence of pathogen resistance phenomenon [1]. This poses risks to hospitals, with 70% of infections in the USA in 2012 caused by bacteria resistant to at least one common antibiotic [2], and now dominates the hospital scene [3]. Bacteria have the ability to quickly develop multidrug resistance, which continues to emerge due to the low production of new antibiotics by pharmaceutical companies [4]. Therefore, development of new antimicrobial molecules with novel mechanisms of action is very important, and antimicrobial peptides (AMPs) are promising candidates to fight against infectious diseases [5]. These AMPs are of natural source and have been discovered in

several organisms such as insects and plants, as well as prokaryotic and eukaryotic cells [6–9].

We focus in this study on caerin 1.1 (GLSLVLSGSAKHLPHV-VPVIAEHL-NH₂) and aurein 1.2 (GLFDIHKKAESF-NH₂), two natural AMPs isolated from the skin secretions of the *Utor* genus of Australian tree frog [10,11]. These two cationic peptides, which exist as random coil in aqueous solution but have α -helical secondary structure in membrane mimetic environments [12,13], are active against a wide range of Gram-negative and Gram-positive bacteria, especially the latter [11]. The mechanism by which AMPs affect cell viability depends on the peptide sequence [14]. Previous studies of caerin 1.1 and aurein 1.2 suggest that they act via a transmembrane [15] and carpet [16] mechanism, respectively. These studies have exploited phospholipid bilayers, generally composed of DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine) or a lipid mixture of DMPC/DMPG (dimyristoyl-phosphatidylglycerol), but ideally peptide-membrane interactions should be studied *in vivo*. The structure, dynamics and orientation of peptides depend on the membrane composition [17] and the envelope of bacteria, which is a very complex system [18]. Gram-negative bacteria have an inner phospholipid membrane, a thin peptidoglycan layer, and an outer membrane mainly composed of lipopolysaccharides (LPS) [19,20]. The LPS are absent in Gram-positive bacteria which do not have an outer membrane, but instead have a thick peptidoglycan layer characterized by the presence of teichoic

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptides; C15:0, pentadecanoic acid; C15:1, cis-10-pentadecenoic acid; C16:0, palmitic acid; C17:1, cis-10-heptadecenoic acid; C18:3, γ -linolenic acid; d₁₁-PA, deuterated palmitic acid; DMPC, dimyristoyl-phosphatidylcholine; DMPG, dimyristoyl-phosphatidylglycerol; DPC, dodecyl phosphocholine; LPS, lipopolysaccharides; LTA, lipoteichoic acid; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; MIC, minimum inhibitory concentration; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; TA, teichoic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: marcotte.isabelle@uqam.ca (I. Marcotte).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.009>
 0005-2736/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

(TAs) and lipoteichoic acids (LTAs) [21]. On the other hand, *B. subtilis* differ from *E. coli* in phospholipid composition. The membrane of *E. coli* is composed of about 75% phosphatidylethanolamine (PE), 20% phosphatidylglycerol (PG) and 5% cardiolipin (CL) and three fatty acid (C16, C17, C18) chain lengths [22]. The membrane of *B. subtilis* contains 60% PG, 34% PE and 6% CL and mainly C15, C16 and C17 acyl chains [23, 24].

Our recently published studies of *E. coli* bacteria show an efficient incorporation of perdeuterated exogenous palmitic acid in the membrane phospholipids [25] with a good signal-to-noise ratio for ^2H solid-state-NMR spectra. Moreover, this study supports the idea of the importance of using bacteria instead of model membranes because interestingly the effect of fullerene nanoparticles on *E. coli* bacteria differs to what has been shown for DPPC/DPPG bilayers [26].

In the present work we have expanded our analysis to investigate the effect of caerin 1.1 and aurein 1.2 on intact *E. coli* (Gram-) and *B. subtilis* (Gram+) bacteria. Given that this is the first reported ^2H NMR study of *B. subtilis*, we first characterized the phospholipid profile of the deuterated *B. subtilis* membranes compared to non-labelled and their temperature behavior. Then, the ^2H NMR spectral moments were exploited to show the effect of the AMPs, caerin 1.1 and aurein 1.2, on the molecular order and dynamics of the lipid acyl chains.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Caerin 1.1 and aurein 1.2 were synthesized by GenScript Corporation (Piscataway Township, NJ, USA) with >95% purity. Dodecyl phosphocholine (DPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Oleic acid (OA), deuterated palmitic acid (d_{31} -PA), deuterium-depleted water and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Canada). *E. coli* BL21 and *B. subtilis* PY79 strains were kindly provided by Prof. S. Jernia (UQAM) and É. Déziel (Institut Armand-Frappier), respectively.

2.1.1. Minimum inhibitory concentration

The activity of caerin 1.1 and aurein 1.2 against *E. coli* and *B. subtilis* was evaluated by measuring the minimum inhibitory concentrations (MIC) using the serial dilution technique [27] in a cell suspension containing 10^4 cells/mL, with the peptide solution at different dilutions. Bacteria were incubated at 37 °C and the absorbance at 600 nm monitored every 30 min over a 24 h period.

2.1.2. Sample preparation

BL21 strain *E. coli* was grown as described [25] with 0.19 mM d_{31} -PA (incorporated into DPC micelles) added in the growth medium with 0.19 mM OA to preserve the fluidity of the membrane [28]. *B. subtilis* (PY79) was also grown with 0.19 mM d_{31} -PA incorporated in the growth medium without oleic acid, but the mid-log growth phase is at an A_{600} of 0.5 compared to 0.4 for *E. coli* [25]. For bacteria exposed to peptide, the pellet was resuspended in 10 mL of Luria broth for 10 min until a homogeneous solution was obtained. Then, the appropriate amount of peptide was added and incubated for 5 min. The samples were centrifuged (1500 g for 10 min at room temperature), and the pellets were then used immediately for ^2H NMR studies.

2.1.3. Lipid analysis and viability of *Bacillus subtilis*

B. subtilis samples were analysed by gas phase chromatography combined with mass spectrometry to determine the fatty acid composition of their membranes. Briefly, lipid extraction was performed in duplicate on approximately 10 mg of lyophilised labelled *B. subtilis* samples using dichloromethane/methanol (2:1 v/v) and 0.88% KCl solution in a Potter glass homogenizer as described in [29]. Polar lipids where then recovered via separation on a silica gel column, with MeOH as

eluent. After evaporation at 40 °C, transesterification was carried out in 2 mL of H_2SO_4 (2% in methanol) and 0.8 mL of toluene for 10 min at 100 °C, then analysed by gas chromatography as described in [25].

B. subtilis samples were also analysed by MTT reduction assays [30] to determine the cellular viability. The cell suspension was diluted in fresh LB medium to an A_{600} of 0.1. A reaction mixture of 20 μL of 5 mg/mL MTT solution and 200 μL of cell suspension was incubated at 37 °C for 20 min. After incubation, the formazan crystals were pelleted and dissolved with 1 mL of dimethylsulfoxide at room temperature. After a 15 min stabilisation at room temperature, the optical density was measured at 550 nm.

2.1.4. NMR experiments and moment analysis

In the case of multi-experiments at different temperatures, ^2H NMR analyses were recorded on a solid-state Bruker Avance III-HD wide bore 400 MHz spectrometer (Milton, Canada) operating at a frequency of 61 MHz for ^2H nuclei. Other experiments were recorded at 37 °C on a 14.1 T hybrid solution/solid-state Bruker Avance III HD (Milton, Canada) operating at a frequency of 92.1 MHz. Static spectra were obtained using the solid-echo pulse sequence [31] with a pulse length of 5 μs , a pulse separation of 60 μs , and a 500 ms recycle delay. Data were collected using 100 k points with a dwell time of 0.5 μs , and a line broadening of 50 Hz was applied. Spectra acquired at 10 kHz MAS frequencies were obtained using a modified Hahn-echo pulse sequence [32,33], with an initial 45° pulse. A total of 8 k points were collected with a dwell time of 0.5 μs and a repetition delay of 500 ms.

A specific quadrupolar splitting is difficult to determine in ^2H solid-state-NMR spectra with a distribution of quadrupolar splittings. Thus, to quantify the intensity distribution of the spectra as a function of quadrupolar splitting, spectral moments M_n [34,35] were calculated from the symmetric ^2H NMR powder patterns using the following equation

$$M_n = \frac{\int_0^\pi \omega^n f(\omega) d\omega}{\int_0^\pi f(\omega) d\omega} \quad (1)$$

where ω is the frequency with respect to the nuclear Larmor angular frequency ω_0 and $f(\omega)$ is the line shape. As shown by Maricq and Waugh [13] and recently reported by Warner [28], to analyse magic angle spinning (MAS) spectra, spectral moments are more simply extracted according to:

$$M_n = \omega_r^n \frac{\sum_{N=0}^n \frac{N!}{n!} A_N}{\sum_{N=0}^n A_N} \quad (2)$$

where ω_r is the spinning rate ($\omega_r = 2\pi\nu_r$, where ν_r is expressed in Hz) and A_N is the area of the Nth sideband.

Spectral moments M_1 and M_2 from static spectra were calculated using the MatNMR software [36] and from MAS spectra using MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). These spectral moments reveal the changes in gel and fluid phases and were used to calculate the relative mean square width of the distribution of quadrupolar splittings (Δ_2), which informs on membrane heterogeneity:

$$\Delta_2 = \frac{M_2}{1.35 M_1^2} - 1. \quad (3)$$

The values from the static or MAS spectral analysis did not differ significantly and, therefore, MAS spectra, which require a much shorter acquisition time are discussed here and the static spectra are shown in Supplementary information.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of ^2H -labelled *B. subtilis*

Prior to studying *B. subtilis* bacteria by NMR, the efficiency of ^2H labelling and its effect on the lipid profile were assessed. The labelling was carried out by growing the bacteria in the presence of d_3 -PA. Contrary to *E. coli*, OA was not used since oleic acid chains are not naturally found in the lipid composition of *B. subtilis*. As shown in Table S1, deuteration levels were close to 60% for saturated (C16:0) lipids. Note that the labelled palmitic acyl chains are incorporated exclusively in the phospholipids and without modification, i.e., 60% of PG, PE and CL palmitic chains are d_3 -labelled. As detailed by Tardy-Laporte et al. [25], the LPS are not deuterated in *E. coli*. According to Koch et al. [37], LTAs typically account for 6–10 mol% in Gram(+) bacteria, and the biosynthesis of LTAs utilizes a fraction of the bacteria's PG pool [38]. Since PG lipids can have various chain lengths, and assuming that 60% of PG lipids with C16:0 acyl chains are deuterated, the total amount of ^2H -labelled LTAs is likely to be negligible and its signal too weak to contribute to the ^2H NMR spectra. Interestingly, the functionally important ratio of total saturated-to-unsaturated lipids was only slightly altered from 58:42 in wild type to 64:36 in labelled *B. subtilis* (Table S1 and Fig. 1). This minor change, therefore, is not expected to significantly alter the membrane fluidity.

We further assessed whether the labelling protocol, the washing procedure or the NMR experiments affected cell viability. As shown in Fig. 1 and Table S2, the changes due to labelling or washing are within the uncertainty of the viability measurement. After 15 h in the NMR spectrometer, during which the growth medium is unchanged and scant due to rotor packing, 40% of the bacteria survived. This percentage is the same as observed with *E. coli* [25] and compatible with *in vivo* studies in particular using the short MAS experiments which further preserve cell viability [28].

The physical state of the membrane lipids was assessed by following the evolution of spectral moments as a function of temperature. It was previously demonstrated that the ^2H solid-state NMR spectra of *E. coli* have "characteristic features" representative of different phases [25, 34]. The ^2H spectra obtained at 15 °C, 30 °C and 52 °C are shown in Fig. S1. At 15 °C, there is a broad spectrum showing the presence of

gel/crystalline phase. At 30 °C, the appearance of shoulders around ± 20 kHz and with a quadrupolar splitting of 30 kHz at the edges of the plateau indicates the presence of the fluid/liquid phase. This plateau slightly decreases at 52 °C with an increase in proportion of the isotropic peak.

The ^2H MAS NMR (Fig. 2) spectrum at 12 °C indicates a higher intensity of spinning sideband manifold, which is characteristic of the gel phase. When the temperature was raised to 52 °C, an increase in the intensity of isotropic peak together with a decrease in the spinning sideband manifold was observed. This is due to motional averaging [34] and supported by the spectral moment analysis (Tables 1 and S3). The decrease in both M_1 and M_2 observed with the rise of temperature is indicative of reduced acyl chain order and spectral distribution, respectively. The value of Δ_2 , which informs on the membrane heterogeneity, was low at 12 °C and 37 °C but increased at 32 °C due to the coexistence of gel and liquid-crystalline phases at this temperature. In summary, the results show that the effectiveness of the deuteration protocol was sufficient to enable NMR studies and has only a minor effect on the lipid profile and resulting physical state of *B. subtilis* membranes.

3.1.1. Effect of caerin 1.1 and aurein 1.2 on *E. coli* and *B. subtilis*

First, we determined the MIC of caerin 1.1 and aurein 1.2 for *E. coli* and *B. subtilis*. The obtained values show that both peptides had an effect on both types of bacteria with a MIC of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *B. subtilis* and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *E. coli* (Table S4). These values are consistent with previous studies [39,40]. The more potent inhibitory effect in the case of *B. subtilis* can be explained by the less complex membrane structure of *B. subtilis*, due to the absence of the outer membrane and the periplasm which facilitate their interaction with phospholipid membranes, and/or the different membrane lipid composition [14,27,41].

Further, in regard to the membrane effects of peptides, Fig. 3 shows the ^2H NMR MAS spectra acquired at 37 °C of labelled *E. coli* and *B. subtilis* when exposed to MIC of caerin 1.1 or aurein 1.2. The ^2H spectra of *E. coli* demonstrate a slight increase in the isotropic peak intensity

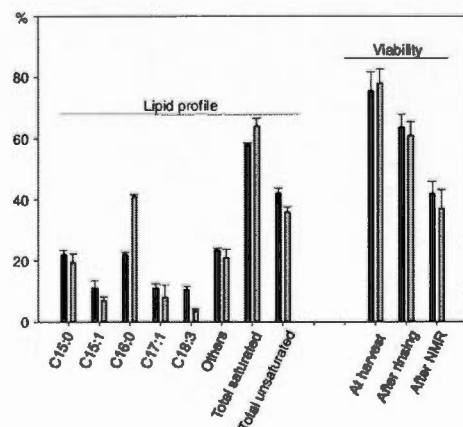


Fig. 1. Effect of deuterium labelling protocol on lipid profile ($n = 2$) and cell viability ($n = 3$) of *B. subtilis*. Black: unlabelled, and gray: ^2H -labelled bacteria.

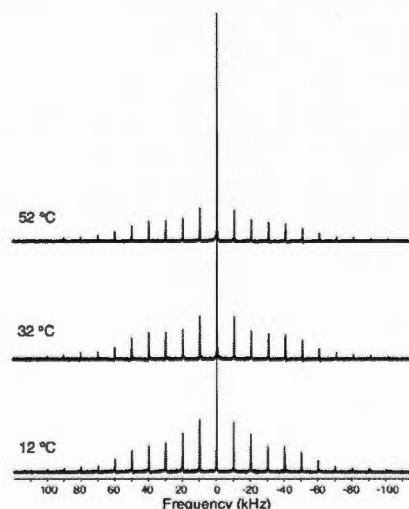


Fig. 2. MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 12 °C, 32 °C and 52 °C with 8 k scans. The equilibration time in these experiments was 15 min.

Table 1
Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labelled *B. subtilis* at different temperatures^a.

T (°C)	M_1 (10^4 s ⁻¹)	M_2 (10^6 s ⁻²)	Δ_2
12	13.7	27.3	0.07
32	11.3	24.5	0.42
37	9.2	14.7	0.12
52	8.2	10.1	0.48

^a Maximum deviations are 10% for M_1 and 14% for M_2 .

with a decrease in that of the spinning sidebands in the presence of either peptide. In parallel, ^2H static NMR spectra of *E. coli* (Fig. S2) confirm the disordering effect with a slight increase in the isotropic peak intensity and a decrease in the width of the shoulders due to the peptides.

The corresponding spectral moments' analysis from ^2H solid-state and MAS NMR spectra, shown in Table S5 and Table 2, respectively, indicates an increase in lipid chain dynamics with a decrease of M_1 from 3.2 to 2.8 and 2.5 in the presence of caerin 1.1 and aurein 1.2, respectively (Table 2). At 37 °C, the membrane phospholipids of *E. coli* are in the fluid phase with a quadrupolar splitting estimated to 40 kHz, and the disorder caused by the presence of the AMPs has increased the proportion of fluid phase. The values of Δ_2 (Table 2) show the coexistence of fluid and gel phases in *E. coli* membranes with an increase from 0.12 to 0.59 and 0.69 in the presence of caerin and aurein, respectively. This increase in the distribution of the quadrupolar splittings in contrast to the decrease in spectral moments is explained by the diminution or the rapid disappearance of CD_3 splittings compared to CD_2 splittings [34].

Table 2 additionally highlights the effect of aurein 1.2 compared to that of caerin 1.1 on *E. coli*, with a higher increase in Δ_2 in the presence of aurein. This result is consistent with the hypotheses by Fernandez et al. [15,39] on the action mechanism of AMPs with model membranes, which suggest that aurein is able to cause an abrupt destabilisation of the membrane and its permeability. Caerin 1.1 rather than aurein 1.2 tends to insert into the phospholipid bilayers by the formation of transmembrane pores with a less destructive effect of the membrane.

Table 2
Spectral moment analysis of the MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of labelled *E. coli* and *B. subtilis*, without and with the presence of AMPs at different concentrations.

Sample	AMP ($\mu\text{g/mL}$)	M_1 (10^4 s ⁻¹)	M_2 (10^6 s ⁻²)	Δ_2
<i>B. subtilis</i> ^a	–	9.2 (0.2) ^b	15 (2)	0.16
+ caerin 1.1	MIC	9.4 (0.6)	15 (1)	0.23
	45	6.6 (0.3)	8 (1)	0.37
	60	4.0	3.3	0.51
+ aurein 1.2	MIC	12 (2)	23 (3)	0.07
	45	13 (3)	27 (4)	0.34
	60	3.8 (0.6)	3 (2)	0.78
<i>E. coli</i> ^a	–	3.2 (0.3)	1.6 (0.7)	0.12
+ caerin 1.1	MIC	2.8 (0.3)	1.6 (0.6)	0.59
+ aurein 1.2	MIC	2.5 (0.2)	1.4 (0.2)	0.69

^a MIC is ~30 $\mu\text{g/mL}$ for *B. subtilis* and ~100 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli*.

^b Standard deviation based on four measurements.

In the case of labelled *B. subtilis*, Fig. 3 shows that the spectrum of these Gram(+) bacteria have a quadrupolar splitting of 120 kHz, higher than that observed for *E. coli* membranes (~40 kHz). This difference indicates that *B. subtilis* membranes are more rigid than those of *E. coli* at 37 °C and is due to the proportion of saturated fatty acids, which is about 64% in *B. subtilis* compared to 51% in *E. coli* [28]. This difference can also be explained by the presence of LTAs in the peptidoglycan of *B. subtilis*, which has a stabilizing effect on lipid membranes. A study by Gutberlet et al. [42] demonstrated that the addition of LTA to a dipalmitoylPG matrix causes an ordering effect on the lipid membrane close to the head group region.

Concerning the spectra of labelled *B. subtilis* exposed to AMPs at MIC, the spectral analysis in Table 2 shows an increase in M_1 and M_2 . M_1 increased in the presence of caerin 1.1 from 9.2 to 9.4, and to 12 in the case of aurein 1.2. This indicates that at the MIC, the interaction of both peptides with *B. subtilis* membrane reduced the dynamics of the lipid chains. This effect was not observed in *E. coli* when exposed to 75 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ of caerin 1.1 (data not shown), which is below the MIC of 100 $\mu\text{g/mL}$.

To better understand the interaction of *B. subtilis* with aurein 1.2 and caerin 1.1, bacteria were then exposed to AMP concentrations of 45 and 60 $\mu\text{g/mL}$, i.e., above the MIC. The spectra are shown in Fig. 4 and the corresponding spectral moments in Table 2. Starting with caerin 1.1,

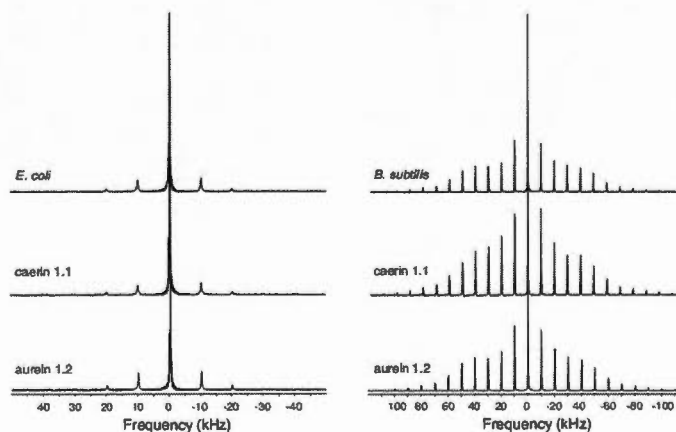


Fig. 3. MAS (10 kHz) ^2H NMR spectra of intact *E. coli* and *B. subtilis* acquired at 37 °C with 8 k scans and with addition of MIC of caerin 1.1 or aurein 1.2.

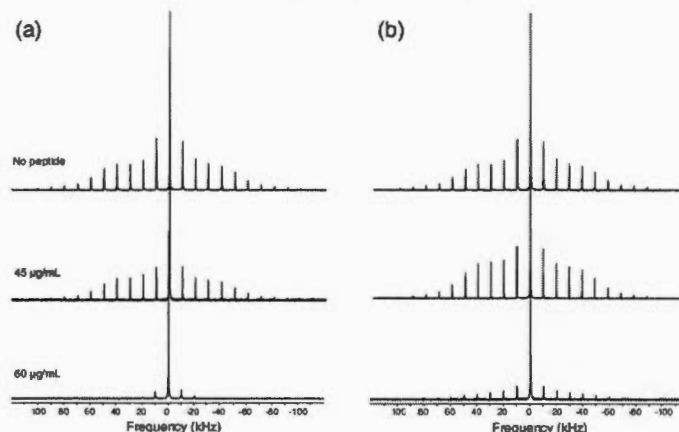


Fig. 4. ^2H MAS NMR spectra of intact *B. subtilis* acquired at 37 °C and with 8 k scans and with the addition of different concentrations of (a) caerin 1.1, and (b) aurein 1.2.

the spectra show a decrease in the intensity of the MAS sidebands with intensification of the isotropic peak. At 45 $\mu\text{g/mL}$, caerin 1.1 exerts its mode of action by disordering the lipid chains. This observation is supported by the decrease of M_1 and M_2 values (Table 2), but a smaller Δ_2 would be expected. As mentioned earlier, this can be explained by the decrease or the rapid disappearance of CD_2 splittings compared to CD_2 splittings [34], but in this case it may also be due to the association of caerin 1.1 and phospholipids causing heterogeneity in the membrane. Disorder was enhanced at 60 $\mu\text{g/mL}$ with the reduction in MAS sidebands from 16 to 4 (Fig. 4), and also with the appearance of 'Feature X' circa ± 10 kHz (Fig. S3) which reports on the degradation of the bacterial cells [34]. 'Feature X' is usually present in the spectra but is only visible in the case of intensive degradation which may be due to the caerin 1.1. Our focus was on short term effects and bacteria, therefore, were not incubated for more than 5 min. Greater effects might be expected using a longer incubation time.

In the case of aurein 1.2, the disorder increase of the lipid chains was observed at 60 $\mu\text{g/mL}$, which means that a higher concentration of aurein is required to exert its mode of action on the *B. subtilis* (Gram+) phospholipid membrane. This may also be related to the smaller size of aurein with 13 residues compared to caerin 1.1 with 25 residues. A specific interaction of aurein 1.2 with TAs and LTAs or other bacterial components may reduce its interaction with the membrane and the disordering effect.

The difference in peptide concentrations, which caused disorder in membrane lipids of Gram(–) and Gram(+) bacteria, highlight the importance of in vivo studies. Gram(+) *B. subtilis* is characterized by a thick peptidoglycan layer which accounts for about 90% dry weight of the membrane [43]. This rigidity is provided by TAs that are covalently bound to peptidoglycan and by the LTAs anchored to the membrane via diacylglycerol. A negatively charged LTA polymer has been demonstrated to interact with cationic peptides [44] and the interaction of PBP10, LL-37 and melittin with LTA inhibits their antimicrobial activity. The inhibition has been suggested to be due to the decrease of peptide adsorption to the bacterial surface [43]. Further, that the disordering effect was not observed at the MIC highlights the idea that the inhibition is not via membrane destabilisation but via the interaction of peptides with other bacterial cell membrane components. Further work,

however, is necessary to elucidate the relative importance and mechanisms of interaction of aurein 1.2 and caerin 1.1 with TAs and LTAs.

4. Conclusion

We have investigated the interaction of caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact Gram(+) and Gram(–) bacteria by ^2H solid-state NMR following deuteration of their membrane lipid acyl chains. To do so, we have proposed a ^2H -labelling protocol for the phospholipids of non-mutated *B. subtilis*. Magic-angle spinning combined to moment analysis allowed collecting high-quality spectra with a reduced number of scans. Aurein 1.2, which was reported to act via a carpet mechanism, was shown to be more membrane disruptive on *E. coli* than caerin 1.1 which is known to form transmembrane pores. The disordering effect observed on the membrane lipids at concentrations higher than the MIC on *B. subtilis* seem to indicate electrostatic interactions of caerin 1.1 and aurein 1.2 with other components present in the peptidoglycan, such as the negatively-charged teichoic and lipoteichoic acids, and suggests that the inhibition effect is not only mediated by membrane destabilisation or disruption. Altogether, our results reveal the importance of in vivo NMR study, where the action mechanism of AMPs was shown to depend on the membrane environment and on the actual peptide concentration at the lipid membrane surface. Our results have led us to develop strategies for two dimensional ^{13}C – ^{15}N solid-state NMR to determine the interaction of AMPs with TA and LTA.

Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant 326750-2013), and the Australian Research Council (grant DP140102127). For the award of scholarships, M.L. is grateful to the Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP), to Pharmaqam and to the Faculté des Sciences de l'Université du Québec à Montréal, and A.E.G. to the

Canadian Institutes of Health Research Chemical Biology training program and the NSERC of Canada. The authors would like to thank É. Déziel and F. Jean-Pierre (INRS-IAF), and M. Babin (UQAR) for technical advice and support, as well as D.E. Warschawski for stimulating discussions. I.M. is a member of the GRASP and the Centre de recherche sur les Matériaux Fonctionnels.

References

- [1] H. Nikaido, Multidrug resistance in bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 139–146.
- [2] R. Bax, D. Griffin, Introduction to antibiotic resistance, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2012) 1–12.
- [3] H.H. Chang, T. Cohen, Y.H. Grad, W.P. Hanage, T.F. O'Brien, M. Lipsitch, Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79 (2015) 101–116.
- [4] A.D. So, N. Gupta, S.K. Brahmachari, I. Chopra, B. Munos, C. Nathan, K. Outerson, J.P. Paccard, D.J. Payne, R.W. Peeling, M. Spigelman, J. Weigelt, Towards new business models for R&D for novel antibiotics, *Drug Resist. Updat.* 14 (2011) 88–94.
- [5] A. Lorin, M. Noel, M.E. Provencier, V. Turcotte, C. Mason, S. Cardinal, P. Lague, N. Voyer, M. Auger, Revisiting peptide amphiphilicity for membrane pore formation, *Biochemistry* 50 (2011) 9409–9420.
- [6] J.M. Conlon, A. Sonnevend, Antimicrobial peptides in frog skin secretions, *Methods Mol. Biol.* 618 (2010) 3–14.
- [7] K. Radek, R. Gallo, Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system, *Semin. Immunopathol.* 29 (2007) 27–43.
- [8] B.M. Peters, M.E. Shirliff, M.A. Jabra-Rizk, Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001067.
- [9] M. Leippe, Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa—effector molecules of primitive phagocytes, *Dev. Comp. Immunol.* 23 (1999) 267–279.
- [10] B.W. Bycroft, R.E. Shute, The molecular basis for the mode of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of resistance, *Pharm. Res.* 2 (1985) 3–14.
- [11] M.A. Apponyi, T.L. Pukala, C.S. Brinkworth, V.M. Maselli, J.H. Bowie, M.J. Tyler, G.W. Booker, J.C. Wallace, J.A. Carver, F. Separovic, J. Doyle, L.E. Llewellyn, Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance, *Peptides* 25 (2004) 1035–1054.
- [12] M.P. Boland, F. Separovic, Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1178–1183.
- [13] B. Chia, J.A. Carver, T.D. Mulhern, J.H. Bowie, Maculatin 1.1, an anti-microbial peptide from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata*, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1894–1908.
- [14] T.-H. Lee, C. Heng, F. Separovic, M.-L. Aguilar, Comparison of reversible membrane destabilisation induced by antimicrobial peptides derived from Australian frogs, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 2205–2215.
- [15] D.I. Fernandez, M.-A. Sani, A.J. Miles, B.A. Wallace, F. Separovic, Membrane defects enhance the interaction of antimicrobial peptides, aurein 1.2 versus caerin 1.1, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1828) 1863–1872.
- [16] D.I. Fernandez, A.P. Le Brun, T.C. Whitwell, M.-A. Sani, M. James, F. Separovic, The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 15739–15751.
- [17] K.J. Hallock, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain, *Biophys. J.* 84 (2003) 3052–3060.
- [18] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The bacterial cell envelope, *CSH Perspect. Biol.* 2 (2010) a000414.
- [19] C.R. Raetz, C. Whitfield, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 635–700.
- [20] H. Nikaido, T. Nakae, The outer membrane of Gram-negative bacteria, *Adv. Microb. Physiol.* 20 (1979) 103–250.
- [21] N. Malanovic, K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 936–946 (2015).
- [22] M. Esfahani, E.M. Barnes Jr., S.J. Wakil, Control of fatty acid composition in phospholipids of *Escherichia coli*: response to fatty acid supplements in a fatty acid auxotroph, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64 (1969) 1057–1064.
- [23] D.G. Bishop, L. Rutberg, B. Samuelsson, The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*, *Eur. J. Biochem.* 2 (1967) 448–453.
- [24] S. Clejan, T.A. Krulwich, K.R. Mondrus, D. Seto-Young, Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkaliphilic strains of *Bacillus* spp., *J. Bacteriol.* 168 (1986) 334–340.
- [25] C. Tardy-Laporte, A.A. Arnold, B. Genard, R. Gastineau, M. Morancès, J.-L. Mouget, R. Tremblay, I. Marcotte, A 2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 614–622.
- [26] P.P. Brisebois, A.A. Arnold, Y.M. Chabre, R. Roy, I. Marcotte, Comparative study of the interaction of fuller nanoparticles with eukaryotic and bacterial model membranes using solid-state NMR and FTIR spectroscopy, *Eur. Biophys. J.* 41 (2012) 535–544.
- [27] K. Yoshida, Y. Mukai, T. Nidome, C. Takashi, Y. Tokunaga, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity, *J. Peptide Res.* 57 (2001) 119–126.
- [28] X.L. Wamet, M. Laadhari, A.A. Arnold, I. Marcotte, D.E. Warschawski, A 2H magic-angle spinning solid-state NMR characterization of lipid membranes in intact bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2016) 146–152.
- [29] F. Pernet, R. Tremblay, Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters, *Lipids* 38 (2003) 1191–1195.
- [30] H. Wang, H. Cheng, F. Wang, D. Wu, X. Wang, An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells, *J. Microbiol. Meth.* 82 (2010) 330–333.
- [31] J. Davis, K. Jeffrey, M. Bloom, M. Valic, T. Higgs, Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains, *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976) 390–394.
- [32] N. Clayden, Computer simulations of 2H MAS NMR spinning sideband spectra, *Chem. Phys. Lett.* 131 (1986) 517–521.
- [33] M. Bloom, J.H. Davis, M.L. Valic, Spectral distortion effects due to finite pulse widths in deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1510–1517.
- [34] J.H. Davis, C.P. Nichol, G. Weeks, M. Bloom, Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuterium magnetic resonance, *Biochemistry* 18 (1979) 2103–2112.
- [35] J. Pius, M.R. Morrow, V. Booth, 2H solid-state nuclear magnetic resonance investigation of whole *Escherichia coli* interacting with antimicrobial peptide MSI-78, *Biochemistry* 51 (2011) 118–125.
- [36] J.D. van Beek, matNMR: a flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab, *J. Magn. Reson.* 187 (2007) 19–26.
- [37] H.U. Koch, R. Haas, W. Fischer, The role of lipoteichoic acid biosynthesis in membrane lipid metabolism of growing *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 357–363.
- [38] M.G. Percy, A. Gründling, Lipoteichoic acid synthesis and function in Gram-positive bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 68 (2014) 81–100.
- [39] D.I. Fernandez, J.D. Gehman, F. Separovic, Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1630–1638.
- [40] B. Chia, Y. Gong, J.H. Bowie, J. Zuegg, M.A. Cooper, Membrane binding and perturbation studies of the antimicrobial peptides caerin, citropin, and maculatin, *Pept. Sci.* 96 (2011) 147–157.
- [41] R.F. Epand, M.A. Schmitt, S.H. Gelman, R.M. Epand, Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α -antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1343–1350.
- [42] T. Gutberlet, J. Frank, H. Bradaczek, W. Fischer, Effect of lipoteichoic acid on thermotropic membrane properties, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 2879–2883.
- [43] N. Malanovic, K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2016) 936–946.
- [44] R. Buck, P.A. Janney, Interaction of the gelatin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 2932–2940.

REFERENCES

- Ackerman, J., Eckman, R. et Pines, A. (1979). Experimental results on deuterium NMR in the solid state by magic angle sample spinning. *Chemical Physics*, 42(3), 423-428.
- Ambroggio, E.E., Separovic, F., Bowie, J.H., Fidelio, G.D. et Bagatolli, L.A. (2005). Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophysical Journal*, 89(3), 1874-1881.
- Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wählin, B., Wade, D., Merrifield, R. et Boman, H.G. (1992). Shortened cecropin A-melittin hybrids Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 296(2), 190-194.
- Apponyi, M.A., Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Maselli, V.M., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Carver, J.A. et Separovic, F. (2004). Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, 25(6), 1035-1054.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M.J. et Walker, J.E. (2000). Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the B subunit of F1Fo ATP synthase. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 482(3), 215-219.
- Arnold, A.A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D.E. et Marcotte, I. (2015). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ¹³C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(1), 369-377.

Atindehou, M. (2012). *Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales: des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de Chromolaena odorata*. Université de Strasbourg; Université d'Abomey-Calavi-Cotonou.

Bax, R. et Griffin, D. (2012). Introduction to antibiotic resistance. *Handbook of Experimental Pharmacology*(211), 1-12.

Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. et Dozois, C.M. (2011). Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 1-10.

Bishop, D., Rutberg, L. et Samuelsson, B. (1967). The chemical composition of the cytoplasmic membrane of Bacillus subtilis. *European Journal of Biochemistry*, 2(4), 448-453.

Bloom, M., Burnell, E.E., MacKay, A.L., Nichol, C.P., Valic, M.I. et Weeks, G. (1978). Fatty acyl chain order in lecithin model membranes determined from proton magnetic resonance. *Biochemistry*, 17(26), 5750-5762.

Bloom, M., Davis, J.H. et Valic, M.I. (1980). Spectral distortion effects due to finite pulse widths in deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Physics*, 58(10), 1510-1517.

Boland, M.P. et Separovic, F. (2006). Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1178-1183. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.010

Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 13(1), 61-92.

Bosch, F. et Rosich, L. (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, 82(3), 171-179.

- Braga, P.C. et Ricci, D. (1998). Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(1), 18-22.
- Brisebois, P.P., Arnold, A.A., Chabre, Y.M., Roy, R. et Marcotte, I. (2012). Comparative study of the interaction of fuller nanoparticles with eukaryotic and bacterial model membranes using solid-state NMR and FTIR spectroscopy. *European Biophysics Journal*, 41(6), 535-544.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Brown, S., Santa Maria, J.P., Jr. et Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67, 313-336. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155620
- Bucki, R. et Janmey, P.A. (2006). Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(9), 2932-2940.
- Butler, M.S. et Cooper, M.A. (2011). Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *The Journal of Antibiotics*, 64(6), 413-425.
- Bycroft, B.W. et Shute, R.E. (1985). The molecular basis for the mode of action of Beta-lactam antibiotics and mechanisms of resistance. *Pharmaceutical Research*, 2(1), 3-14.
- Byers, D.M. (1989). Elongation of exogenous fatty acids by the bioluminescent bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 59-64.
- Byers, D.M. et Shen, Z. (2002). Biochemical evidence against protein-mediated uptake of myristic acid in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(10), 933-939.

- Chang, H.H., Cohen, T., Grad, Y.H., Hanage, W.P., O'Brien, T.F. et Lipsitch, M. (2015). Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 101-116.
- Chao, J.A., Yoon, Y.J. et Singer, R.H. (2012). Imaging translation in single cells using fluorescent microscopy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a012310.
- Chia, B., Carver, J.A., Mulhern, T.D. et Bowie, J.H. (2000). Maculatin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata*. *European Journal of Biochemistry*, 267(7), 1894-1908.
- Chia, B., Gong, Y., Bowie, J.H., Zuegg, J. et Cooper, M.A. (2011). Membrane binding and perturbation studies of the antimicrobial peptides caerin, citropin, and maculatin. *Peptide Science*, 96(2), 147-157.
- Clayden, N. (1986). Computer simulations of 2 H MAS NMR spinning sideband spectra. *Chemical Physics Letters*, 131(6), 517-521.
- Clejan, S., Krulwich, T.A., Mondrus, K.R. et Seto-Young, D. (1986). Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 168(1), 334-340.
- Conlon, J.M. et Sonnevend, A. (2010). Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods in Molecular Biology* 618, 3-14.
- Davies, J. et Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Davis, H, J., Ziani, L. et Schmidt, M.L. (2013). Critical fluctuations in DOPC/DPPC-d62/cholesterol mixtures: 2H magnetic resonance and relaxation. *The Journal of Chemical Physics*, 139(4), 045104.

- Davis, J.H, Nichol, C.P., Weeks, G. et Bloom, M. (1979). Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry*, 18(10), 2103-2112.
- Davis, JH et Jeffrey, K. (1977). The temperature dependence of chain disorder in potassium palmitate-water. A deuterium NMR study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 20(2), 87-104.
- Davis, JH, Jeffrey, K., Bloom, M., Valic, M. et Higgs, T. (1976). Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters*, 42(2), 390-394.
- De Jonge, B., Chang, Y.-S., Gage, D. et Tomasz, A. (1992). Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11248-11254.
- Dowhan, W. et Bogdanov, M. (2002). Functional roles of lipids in membranes. *New Comprehensive Biochemistry*, 36, 1-35.
- Dufrêne, Y.F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of bacteriology*, 184(19), 5205-5213.
- Epand et Epand, R.F. (2011). Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, 17(5), 298-305.
- Epand, R.F., Schmitt, M.A., Gellman, S.H. et Epand, R.M. (2006). Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1343-1350.
- Esfahani, M., Barnes, E.M., Jr. et Wakil, S.J. (1969). Control of fatty acid composition in phospholipids of *Escherichia coli*: response to fatty acid supplements in a fatty acid auxotroph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(3), 1057-1064.

- Fan, T.W.-M. (1996). Metabolite profiling by one-and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28(2), 161-219.
- Fehri, L.F., Wróblewski, H. et Blanchard, A. (2007). Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2), 468-474.
- Fernández-Suárez, M. et Ting, A.Y. (2008). Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 929-943.
- Fernandez, D.I., Gehman, J.D. et Separovic, F. (2009). Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1630-1638.
- Fernandez, D.I., Le Brun, A.P., Whitwell, T.C., Sani, M.-A., James, M. et Separovic, F. (2012). The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(45), 15739-15751.
- Fernandez, D.I., Sani, M.-A., Miles, A.J., Wallace, B.A. et Separovic, F. (2013). Membrane defects enhance the interaction of antimicrobial peptides, aurein 1.2 versus caerin 1.1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(8), 1863-1872.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226.
- Folch, J., Lees, M. et Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gee, M.L., Burton, M., Grevis-James, A., Hossain, M.A., McArthur, S., Palombo, E.A., Wade, J.D. et Clayton, A.H. (2013). Imaging the action of antimicrobial peptides on living bacterial cells. *Scientific reports*, 3, 1557.

- Gehman, J.D., Luc, F., Hall, K., Lee, T.-H., Boland, M.P., Pukala, T.L., Bowie, J.H., Aguilar, M.-I. et Separovic, F. (2008). Effect of Antimicrobial Peptides from Australian Tree Frogs on Anionic Phospholipid Membranes†. *Biochemistry*, 47(33), 8557-8565.
- Gennaro, R. et Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 55(1), 31-49.
- Ghosh, U., Xie, L. et Weliky, D.P. (2013). Detection of closed influenza virus hemagglutinin fusion peptide structures in membranes by backbone ^{13}C - ^{15}N rotational-echo double-resonance solid-state NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 55(2), 139-146.
- Gillet, B., Bléneau, S. et Beloeil, J. Caractérisation des phospholipides et des triglycérides par RMN. *Édition Diffusion Presse Sciences*, 1000, 26.
- Glaubitx, C., Burnett, I.J., Gröbner, G., Mason, A.J. et Watts, A. (1999). Deuterium-MAS NMR spectroscopy on oriented membrane proteins: applications to photointermediates of bacteriorhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, 121(24), 5787-5794.
- Gutberlet, T., Frank, J., Bradaczek, H. et Fischer, W. (1997). Effect of lipoteichoic acid on thermotropic membrane properties. *Journal of Bacteriology*, 179(9), 2879-2883.
- Hadley, E. et Hancock, R. (2010). Strategies for the discovery and advancement of novel cationic antimicrobial peptides. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(18), 1872-1881.
- Hallock, K.J., Lee, D.-K. et Ramamoorthy, A. (2003). MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophysical Journal*, 84(5), 3052-3060.

- Hallock, K.J., Wildman, K.H., Lee, D.-K. et Ramamoorthy, A. (2002). An innovative procedure using a sublimable solid to align lipid bilayers for solid-state NMR studies. *Biophysical Journal*, 82(5), 2499-2503.
- Hancock, R.E. et Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, 8(9), 402-410.
- Hancock, R.E. et Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8856-8861.
- Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M.F., Gerthsen, D. et Ulrich, A.S. (2010). Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(8), 3132-3142.
- Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K. et Foster, S.J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14603-14608.
- Hing, A.W., Vega, S. et Schaefer, J. (1992). Transferred-echo double-resonance NMR. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 96(1), 205-209.
- Hoskin, D.W. et Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica Biophysica Acta*, 1778(2), 357-375.
- Hsu, C.-H., Chen, C., Jou, M.-L., Lee, A.Y.-L., Lin, Y.-C., Yu, Y.-P., Huang, W.-T. et Wu, S.-H. (2005). Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic acids research*, 33(13), 4053-4064.
- Husted, C., Montez, B., Le, C., Moscarello, M.A. et Oldfield, E. (1993). Carbon-13 "magic-angle" sample-spinning nuclear magnetic resonance studies of human myelin, and model membrane systems. *Magnetic Resonance in Medicine*, 29(2), 168-178.

- Ianzini, F., Guidoni, L., Simone, G., Viti, V. et Yatvin, M. (1990). Effects of decreased pH on membrane structural organization of *Escherichia coli* grown in different fatty acid-supplemented media: a ³¹P NMR study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 1-10.
- Ingram, L. (1977). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1233-1236.
- Jacobson, K., Mouritsen, O.G. et Anderson, R.G. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology*, 9(1), 7-14.
- Janes, N. (1996). Curvature stress and polymorphism in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 81(2), 133-150.
- Jenssen, H., Hamill, P. et Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
- Jiang, Y., Morgan-Kiss, R.M., Campbell, J.W., Chan, C.H. et Cronan, J.E. (2010). Expression of *Vibrio harveyi* acyl-ACP synthetase allows efficient entry of exogenous fatty acids into the *Escherichia coli* fatty acid and lipid A synthetic pathways. *Biochemistry*, 49(4), 718-726.
- Kamio, Y. et Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15(12), 2561-2570.
- Kamysz, W., Nadolski, P., Kedzia, A., Cirioni, O., Barchiesi, F., Giacometti, A., Scalise, G., Lukasiak, J. et Okroj, M. (2006). In vitro activity of synthetic antimicrobial peptides against *Candida*. *Polish Journal of Microbiology*, 55(4), 303-307.
- Kem, T., Giffard, M., Hediger, S., Amoroso, A., Giustini, C., Bui, N.K., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W. et Simorre, J.-P. (2010). Dynamics characterization

of fully hydrated bacterial cell walls by solid-state NMR: evidence for cooperative binding of metal ions. *Journal of the American Chemical Society*, 132(31), 10911-10919.

Kern, T., Hediger, S., Müller, P., Giustini, C.c., Joris, B., Bougault, C., Vollmer, W. et Simorre, J.-P. (2008). Toward the characterization of Peptidoglycan Structure and Protein– Peptidoglycan Interactions by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(17), 5618-5619.

Kim, S.J., Cegelski, L., Studelska, D.R., O'Connor, R.D., Mehta, A.K. et Schaefer, J. (2002). Rotational-echo double resonance characterization of vancomycin binding sites in *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 41(22), 6967-6977.

Koch, H.U., HAAS, R. et FISCHER, W. (1984). The role of lipoteichoic acid biosynthesis in membrane lipid metabolism of growing *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*, 138(2), 357-363.

Krašovec, R. et Jerman, I. (2003). Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance. *Medical Hypotheses*, 60(4), 484-488.

Lai, R., Liu, H., Lee, W.H. et Zhang, Y. (2002). An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(4), 796-799.

Lee, T.-H., Heng, C., Separovic, F. et Aguilar, M.-I. (2014). Comparison of reversible membrane destabilisation induced by antimicrobial peptides derived from Australian frogs. *Biochimica Biophysica Acta*, 1838(9), 2205-2215.

Lee, T.-H., Heng, C., Swann, M.J., Gehman, J.D., Separovic, F. et Aguilar, M.-I. (2010). Real-time quantitative analysis of lipid disordering by aurein 1.2 during membrane adsorption, destabilisation and lysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(10), 1977-1986.

Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa-effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4), 267-279.

- Levitt, M.H. (2008). *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*.
- Lichter, C.D.R.L. (1987). *NMR spectroscopy techniques*. New York.
- Livermore, D.M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., Norrby, R. et Tillotson, G. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkr262.
- Lorin, A.I., Noël, M., Provencher, M.-E.v., Turcotte, V., Masson, C., Cardinal, S.b., Lagüe, P., Voyer, N. et Auger, M.I. (2011). Revisiting peptide amphiphilicity for membrane pore formation. *Biochemistry*, 50(43), 9409-9420.
- Macomber, R.S. (1998). *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*,. New York : Wiley-Interscience.
- Malanovic , N. et Lohner, K. (2015). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 936-946.
- Malanovic, N. et Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(5), 936-946.
- Marcotte, I. (2016). Notes de cours, CHI-7180: Méthodes d'analyse spectroscopiques avancées, Université du Québec à Montréal (UQAM).
- Marcotte, I. et Booth, V. (2014). 2H Solid-State NMR Study of Peptide–Membrane Interactions in Intact Bacteria. *Advances in biological solid-state NMR: proteins and membrane-active peptides. The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 459-475.
- Marcotte, I., Wegener, K.L., Lam, Y.-H., Chia, B.C., de Planque, M.R., Bowie, J.H., Auger, M. et Separovic, F. (2003). Interaction of antimicrobial peptides from

- Australian amphibians with lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 122(1), 107-120.
- Maricq, M.M. et Waugh, J. (1979). NMR in rotating solids. *The Journal of Chemical Physics*, 70(7), 3300-3316.
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E. et Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162(4), 363-374.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. et Samain, J.-F. (1992). Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 163(2), 221-234.
- Matsuoka, S. et Inoue, M. (2009). Application of REDOR NMR in natural product chemistry. *Chemical Communications*(38), 5664-5675.
- Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K.-i., Fujii, N. et Miyajima, K. (1997). Modulation of magainin 2– lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*, 36(8), 2104-2111.
- Michel, A.-S. (2010). *À la découverte des peptides antimicrobiens*.
- Mor, A., Hani, K. et Nicolas, P. (1994). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31635-31641.
- Morein, S., Andersson, A.-S., Rilfors, L. et Lindblom, G. (1996). Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6801-6809.
- Mularski, A., Wilksch, J.J., Wang, H., Hossain, M.A., Wade, J.D., Separovic, F., Strugnell, R.A. et Gee, M.L. (2015). Atomic force microscopy reveals the

mechanobiology of lytic peptide action on bacteria. *Langmuir*, 31(22), 6164-6171.

Niedziela, T., Dag, S., Lukaszewicz, J., Dzieciatkowska, M., Jachymek, W., Lugowski, C. et Kenne, L. (2006). Complete lipopolysaccharide of *Plesiomonas shigelloides* O74: H5 (strain CNCTC 144/92). 1. Structural analysis of the highly hydrophobic lipopolysaccharide, including the O-antigen, its biological repeating unit, the core oligosaccharide, and the linkage between them. *Biochemistry*, 45(35), 10422-10433.

Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119.

Nikaido, H. et Nakae, T. (1979). The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 20, 163-250.

Oldfield, E., Chapman, D. et Derbyshire, W. (1972). Lipid mobility in *Acholeplasma* membranes using deuterium magnetic resonance. *Chemistry and Physics of Lipids*, 9(1), 69-81.

Oldfield, E., Chapman, D. et W, D. (1971). Deuteron resonance: a novel approach to the study of hydrocarbon chain mobility in membrane systems. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 16(2), 102-104.

Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B. et Shai, Y. (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochemical Journal*, 341(Pt 3), 501.

Ouellet, M., Doucet, J.-D., Voyer, N. et Auger, M. (2007). Membrane topology of a 14-mer model amphipathic peptide: a solid-state NMR spectroscopy study. *Biochemistry*, 46(22), 6597-6606.

Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V.J. et Habeck, M. (2012). Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic

antimicrobial peptide present in human sweat. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8434-8443.

Peersen, O.B. et Smith, S.O. (1993). Rotational resonance NMR of biological membranes. *Concepts in Magnetic Resonance*, 5(4), 303-317.

Percy, M.G. et Gründling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 68, 81-100.

Pernet, F. et Tremblay, R. (2003). Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters. *Lipids*, 38(11), 1191-1195.

Peters, B.M., Shirliff, M.E. et Jabra-Rizk, M.A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLOS Pathogens*, 6(10), e1001067.

Pius, J., Morrow, M.R. et Booth, V. (2011). ²H solid-state nuclear magnetic resonance investigation of whole *Escherichia coli* interacting with antimicrobial peptide MSI-78. *Biochemistry*, 51(1), 118-125.

Pochapsky, T.C.P.S.S. (2007). *NMR for physical and biological scientists*. New York : Garland science.

Powers, J.-P.S. et Hancock, R.E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691.

Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Carver, J.A. et Bowie, J.H. (2004). Investigating the importance of the flexible hinge in caerin 1.1: solution structures and activity of two synthetically modified caerin peptides. *Biochemistry*, 43(4), 937-944.

Radek, K. et Gallo, R. (2007). Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Seminars in Immunopathology*, 29(1), 27-43.

- Radhakrishnan, A. et McConnell, H. (2007). Composition fluctuations, chemical exchange, and nuclear relaxation in membranes containing cholesterol. *The Journal of Chemical Physics*, 126(18), 185101.
- Raetz, Reynolds, C.M., Trent, M.S. et Bishop, R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 295.
- Raetz, C.R. et Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- Rajanbabu, V. et Chen, J.-Y. (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2), 415-420.
- Renault, M., Tommassen-van Boxtel, R., Bos, M.P., Post, J.A., Tommassen, J. et Baldus, M. (2012). Cellular solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4863-4868.
- Romantsov, T., Guan, Z. et Wood, J.M. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(10), 2092-2100.
- Rozek, T., Waugh, R.J., Steinborner, S.T., Bowie, J.H., Tyler, M.J. et Wallace, J.C. (1998). The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. *Journal of Peptide Science*, 4(2), 111-115.
- Rozek, T., Wegener, K.L., Bowie, J.H., Olver, I.N., Carver, J.A., Wallace, J.C. et Tyler, M.J. (2000). The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5330-5341.
- Ruiz, N., Kahne, D. et Silhavy, T.J. (2009). Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 677-683.

- Ryu, Y.H., Baik, J.E., Yang, J.S., Kang, S.-S., Im, J., Yun, C.-H., Kim, D.W., Lee, K., Chung, D.K. et Ju, H.R. (2009). Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *International Immunopharmacology*, 9(1), 127-133.
- Sani, M.-A. et Separovic, F. (2016). How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of chemical research*, 49(6), 1130-1138.
- Schmidt, R., K. et Spiess, W.H. (1994). Multidimensional Solid-State NMR and Polymers, Académie Press Inc., San Diego. 478 p.
- Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10(03), 353-418.
- Seelig, J. et Macdonald, P.M. (1987). Phospholipids and proteins in biological membranes. Deuterium NMR as a method to study structure, dynamics, and interactions. *Accounts of Chemical Research*, 20(6), 221-228.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1), 55-70.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236-248.
- Shai, Y. et Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629-1641.
- Shibuya, I. (1992). Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in Escherichia coli. *Progress in Lipid Research*, 31(3), 245-299.
- Silhavy, T.J., Kahne, D. et Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414.

- So, A.D., Gupta, N., Brahmachari, S.K., Chopra, I., Munos, B., Nathan, C., Outtersson, K., Paccaud, J.P., Payne, D.J., Peeling, R.W., Spigelman, M. et Weigelt, J. (2011). Towards new business models for R&D for novel antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 88-94.
- Taheri-Araghi, S., Brown, S.D., Sauls, J.T., McIntosh, D.B. et Jun, S. (2015). Single-cell physiology. *Annual review of biophysics*, 44, 123-142.
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A.A., Genard, B., Gastineau, R., Moranc ais, M., Mouget, J.-L., Tremblay, R. et Marcotte, I. (2013). A 2 H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(2), 614-622.
- Thayer, A.M. (2016). Will the bugs always win? *CHEMICAL & ENGINEERING NEWS*, 94(35), 36-43.
- Toke, O.C., L. (2007). In *eMagRes*. UK: Chichester.
- van Beek, J.D. (2007). matNMR: a flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab. *Journal of Magnetic Resonance*, 187(1), 19-26.
- Veatch, S.L., Soubias, O., Keller, S.L. et Gawrisch, K. (2007). Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17650-17655.
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 287-306.
- Wang, Guangshun, Li, X. et Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1), D933-D937.

- Wang, Jinbo, Qi, L., Mei, L., Wu, Z. et Wang, H. (2016). C. butyricum lipoteichoic acid inhibits the inflammatory response and apoptosis in HT-29 cells induced by S. aureus lipoteichoic acid. *International journal of biological macromolecules*, 88, 81-87.
- Wang, G. (2010). *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*. (Vol. 18) : Cabi.
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D. et Wang, X. (2010). An improved 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), 330-333.
- Warnet, X.L., Laadhari, M., Arnold, A.A., Marcotte, I. et Warschawski, D.E. (2016). A ^2H magic-angle spinning solid-state NMR characterisation of lipid membranes in intact bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(1), 146-152.
- Wegener, K.L., Brinkworth, C.S., Bowie, J.H., Wallace, J.C. et Tyler, M.J. (2001). Bioactive dahlein peptides from the skin secretions of the Australian aquatic frog *Litoria dahlii*: sequence determination by electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(18), 1726-1734.
- Wegener, K.L., Wabnitz, P.A., Carver, J.A., Bowie, J.H., Chia, B., Wallace, J.C. et Tyler, M.J. (1999). Host defence peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree-frog *Litoria citropa*. *European Journal of Biochemistry*, 265(2), 627-637.
- Wong, H., Bowie, J.H. et Carver, J.A. (1997). The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 545-557.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L. et Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal*, 81(3), 1475-1485.

- Yeaman, M.R. et Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27-55.
- Yoshida, K., Mukai, Y., Niidome, T., Takashi, C., Tokunaga, Y., Hatakeyama, T. et Aoyagi, H. (2001). Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *Journal of Peptide Research*, 57(2), 119-126.
- Zhang, Y.-M. et Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 222-233.
- Ziemska, J., Rajnisz, A. et Solecka, J. (2013). New perspectives on antibacterial drug research. *Central European Journal of Biology*, 8(10), 943-957.
- Zucht, H.-D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.-J. et Forssmann, W.-G. (1995). Casocidin-I: a casein- α s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS letters*, 372(2-3), 185-188.